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

**Caracterização do comportamento alimentar de *Bucephalogonia xanthophis*
(Berg) (Hemiptera: Cicadellidae) em citros e suas implicações na transmissão
de *Xylella fastidiosa***

Marcelo Pedreira de Miranda

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

**Piracicaba
2008**

Marcelo Pedreira de Miranda
Engenheiro Agrônomo

**Caracterização do comportamento alimentar de *Bucephalogonia xanthophis* (Berg)
(Hemiptera: Cicadellidae) em citros e suas implicações na transmissão de *Xylella fastidiosa***

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

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

Piracicaba
2008

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - ESALQ/USP

Miranda, Marcelo Pedreira de

Caracterização do comportamento alimentar de *Bucephalogonia xanthophis* (Berg) (Hemiptera: Cicadellidae) em citros e suas implicações na transmissão de *Xylella fastidiosa* / Marcelo Pedreira de Miranda. - - Piracicaba, 2008. 87 p.

Tese (Doutorado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2008.
Bibliografia.

1. Bactérias fitopatogênicas 2. Cigarrinha 3. Citricultura 4. Clorose variegada dos citros 5. Comportamento animal 6. Xilema I. Título

CDD 634.3

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

Dedico

Aos meus Pais, Artur e Lia,

Por me ensinarem o caminho da honestidade, responsabilidade e sobretudo pelo amor e constante apoio

Ofereço

Aos meus irmãos Leonardo e Felipe

AGRADECIMENTOS

À Deus, por sempre estar ao meu lado iluminando e guiando o meu caminho.

Ao Prof. Dr. João Roberto Spotti Lopes, pela orientação, amizade, e confiança, demonstrados durante seis anos de pós-graduação, fatores estes que seguramente foram imprescindíveis para a concretização deste trabalho e para minha formação profissional.

Ao Dr. Alberto Fereres (ICA/CSIC, Madrid), pela amizade, receptividade e ensinamentos, os quais foram fundamentais para a realização deste trabalho.

Ao Dr. Ernesto Prado, pelas sugestões e auxílios, essenciais para implantação e desenvolvimento deste trabalho.

À Profa. Dra. Beatriz Appezzato-da-Glória, pela orientação e por disponibilizar seu laboratório para realização dos estudos histológicos.

Aos professores do Departamento de Entomologia, Fitopatologia e Zoologia Agrícola da ESALQ/USP, pelos ensinamentos transmitidos.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de estudos e apoio financeiro para realização deste trabalho.

Aos amigos de República: Edmilson S. Silva, Laércio A. de Carvalho, Genelício R. Cruzoé, Geraldo J. N. de Vasconcelos, Rodrigo N. Marques, Fernando S. Rodrigues, Eduardo V. Primiano, Daniel F. Ferreira, Alberto D.G. Alvarado, John J. S. Ausique e Samuel Roggia pelos momentos de descontração, sugestões e auxílio durante o curso.

Ao casal de amigos e irmãos Edmilson S. Silva e Jurema R. Q. Silva pelo carinho demonstrado durante os quatro anos de convivência em Piracicaba.

Aos “tios” Pacheco, Vera, Altamiro, Glorinha e “primos” Cyntia, Verena, Cristiane, Mario e Gabriel pelos raros, porém bons momentos de descontração durante estes anos em São Paulo.

Aos colegas e amigos do Laboratório de Insetos Vetores: Alexandre, Cristiane, Cristiane Lima, Danilo, Daniele, Érica, Fernanda, Fernando, Eduardo, Flávio, Joyce, Lucas, Maria Teresa, Patrick, Rodrigo, Simone, Teresinha, e Rudiney pela convivência harmoniosa que foram imprescindíveis para a concretização deste trabalho.

Aos amigos da boa terra: Bruno, Melissa, Tales, Amâncio, Taís, Rose, Alex, Suane pela amizade, ajuda e momentos de descontração.

Aos colegas e amigos do ICA/CSIC, Madri: Ainoa, Assusena, Beatriz, Elisa, Emilio, Javi, Juan, Mônica, Nacho, Mar, Maria, Marina, Saioa, Poti e Victor, pela receptividade, ajuda na condução dos trabalhos e amizade.

Às bibliotecárias Silvia M. Zinsly e Eliana M. Garcia, pela colaboração na correção das referências bibliográficas e normas da tese.

Aos amigos da Pós-graduação em Entomologia, pelo companheirismo e momentos de descontração.

Aos funcionários do Setor de Entomologia da ESALQ/USP, pela amizade e apoio na condução dos trabalhos.

SUMÁRIO

RESUMO.....	8
ABSTRACT.....	9
1 INTRODUÇÃO.....	10
Referências.....	14
2 LOCAIS E PERÍODO DE ALIMENTAÇÃO DA CIGARRINHA VETORA DE <i>Xylella fastidiosa</i> , <i>Bucephalogonia xanthophis</i> (BERG) (HEMIPTERA: CICADELLIDAE), EM MUDAS CÍTRICAS.....	17
Resumo.....	17
Abstract.....	17
2.1 Introdução.....	18
2.2 Desenvolvimento.....	19
2.2.1 Material e Métodos.....	20
2.2.2 Resultados e Discussão.....	21
2.3 Conclusão.....	26
Referências.....	26
3 CARACTERIZAÇÃO DOS PADRÕES DE “ELECTRICAL PENETRATION GRAPHS” (EPG) DE <i>Bucephalogonia xanthophis</i> (BERG) (HEMIPTERA: CICADELLIDAE), VETOR DE <i>Xylella fastidiosa</i> EM CITROS.....	30
Resumo.....	30
Abstract.....	30
3.1 Introdução.....	31
3.2 Desenvolvimento.....	32
3.2.1 Material e Métodos.....	32
3.2.2 Resultados.....	35
3.2.3 Discussão.....	38
Referências.....	49
4 ASSOCIAÇÃO DE ATIVIDADES ESTILETARES DA CIGARRINHA <i>Bucephalogonia xanthophis</i> (Berg) (Hemiptera: Cicadellidae) COM A TRANSMISSÃO DE <i>Xylella fastidiosa</i> EM CITROS.....	54
Resumo.....	54

Abstract.....	54
4.1 Introdução.....	55
4.2 Desenvolvimento.....	57
4.2.1 Material e Métodos.....	57
4.2.2 Resultados e Discussão.....	60
Referências.....	65
5 INFLUENCIA DE PLANTAS CÍTRICAS INFECTAS COM <i>Xylella fastidiosa</i> SOBRE A	
PENETRAÇÃO ESTILETAR DE <i>Bucephalogonia xanthophis</i> (BERG) (HEMIPTERA:	
CICADELLIDAE)	
Resumo.....	72
Abstract.....	72
5.1 Introdução.....	73
5.2 Desenvolvimento.....	75
5.2.1 Material e Métodos.....	75
5.2.2 Resultados.....	77
5.2.3 Discussão.....	78
Referências.....	84

RESUMO

Caracterização do comportamento alimentar de *Bucephalogonia xanthophis* (Berg) (Hemiptera: Cicadellidae) em citros e suas implicações na transmissão de *Xylella fastidiosa*

Xylella fastidiosa é uma bactéria limitada ao xilema de plantas, sendo transmitida principalmente por cigarrinhas da subfamília Cicadellinae (Hemiptera: Cicadellidae). No Brasil, é o agente causal da Clorose variegada dos citros (CVC), doença que afeta laranja-doce [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck]. O objetivo deste trabalho foi caracterizar o comportamento alimentar da cicadélíneo vetor *Bucephalogonia xanthophis* (Berg) em citros e correlacionar suas atividades estiletares com a transmissão de *X. fastidiosa*. Inicialmente, testes de escolha e análises de excreção de honeydew foram realizadas para determinar os locais e períodos preferidos para alimentação em mudas de citros. *B. xanthophis* preferiu a haste dos ramos novos, na parte superior da muda. Esta cigarrinha ingeriu seiva do xilema e apresentou maior volume médio de excreção e maior percentual de indivíduos que excretaram durante a fotofase. Assim, estudou-se a penetração estiletar do vetor na haste de brotações cítricas, durante a fotofase, pela técnica de “Electrical Penetration Graph” (EPG, sistema DC). Os principais padrões de EPG foram correlacionados com análises histológicas e de “honeydew” para determinação da posição exata dos estiletes no tecido vegetal e atividades envolvidas. Seis padrões foram descritos: (S) secreção de bainha salivar e caminhamento dos estiletes através de células da epiderme ou parênquima; (R) estiletes inseridos na planta, porém sem nenhuma atividade aparente; (X) contato dos estiletes com os vasos do xilema; (Xi) ingestão ativa no xilema; (I) breve interrupção durante X ou Xi; (W) retirada dos estiletes da planta. Durante uma prova, a seqüência de eventos com maior probabilidade de ocorrência foi penetração estiletar através da epiderme e parênquima (S) (100% dos insetos), seguida de contato com o xilema (X) (67,6%). Entre os indivíduos que exibem o padrão X, 88,3% passam para Xi. Os vasos do xilema foram localizados pelo inseto após uma média de 2,2 provas. O tempo médio para atingir o xilema (X) e iniciar ingestão (Xi) após o início da primeira prova foi 27,8 min e 34,2 min, respectivamente. Entretanto, verificou-se ingestão prolongada no xilema (Xi > 5 min) somente após 39,8 min, em média. Em um outro estudo, investigou-se a relação dos padrões S, X e Xi com os processos de aquisição e inoculação de *X. fastidiosa* em citros. *B. xanthophis* adquiriu *X. fastidiosa* somente no padrão Xi. Após 1 h de ingestão no xilema, esta cigarrinha transmitiu a bactéria para plantas-teste com uma eficiência de 7,7%. A inoculação ocorreu durante os padrões S, S+X e S+X+Xi, com eficiência de 3,5; 7,1 e 7,4%, respectivamente. Um fato intrigante foi a ocorrência de inoculação de *X. fastidiosa* pelo inseto antes de atingir os vasos do xilema, durante o padrão S. Contudo, as maiores taxas de transmissão ocorreram após o contato com o xilema (S+X ou S+X+Xi). Por fim, estudou-se o efeito da infecção sintomática e assintomática por *X. fastidiosa* em plantas cítricas sobre a penetração estiletar de *B. xanthophis*. O comportamento alimentar foi semelhante em plantas saudáveis e infectadas sem sintomas. A infecção sintomática não afetou a capacidade de *B. xanthophis* localizar os vasos do xilema, mas reduziu o tempo gasto por este inseto ingerindo seiva dos mesmos. Estes resultados sugerem que a aquisição de *X. fastidiosa* pode ser mais eficiente em plantas infectadas assintomáticas do que em plantas com sintomas severos de CVC. As informações sobre penetração estiletar do vetor *B. xanthophis* em citros são importantes para estudos mais avançados de mecanismos de transmissão de *X. fastidiosa*, bem como para estabelecer estratégias que visem interferir neste processo.

Palavras-chave: CVC, bactéria fitopatogênica, inseto vetor, comportamento alimentar

ABSTRACT

Characterization of feeding behavior of *Bucephalogonia xanthophis* (Berg) (Hemiptera: Cicadellidae) in citrus and its implications for transmission of *Xylella fastidiosa*

Xylella fastidiosa is a xylem-limited bacterium transmitted mainly by leafhoppers (Hemiptera: Cicadellidae) in the subfamily Cicadellinae. In Brazil, it is the causal agent of Citrus variegated chlorosis, a disease that affects sweet orange [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck]. The goal of this research was to characterize the feeding behavior of the cicadeline vector *Bucephalogonia xanthophis* (Berg) in citrus and correlate its feeding activities with transmission of *X. fastidiosa*. Initially, choice tests and honeydew excretion analyses were carried out to determine preferred feeding sites and periods on citrus nursery trees. *B. xanthophis* preferred the stems of young shoots, in the upper part of the plant. This species ingested sap from the xylem vessels and showed larger excretion volume and higher proportion of excreting individuals during the day. Thus, vector stylet penetration was studied on the stem of citrus shoots in the photophase, by using the Electrical Penetration Graph (EPG, DC system) technique. The main EPG waveforms were correlated with histological and honeydew excretion analyses to determine the precise stylet position in the plant tissue and feeding activities. Six waveforms and proposed activities are described: (S) secretion of salivary sheath and intracellular pathway; (R) stylets inserted into the plant, without any apparent activity; (X) contact of stylets with xylem vessels; (Xi) active xylem ingestion; (I) interruption between X and Xi; and (W) stylet withdrawal from the plant. During a probe, the most likely sequence of events is stylet pathway (S) through epidermal and parenchymal cells (all individuals), followed by contact with xylem (X) (67.6% of all individuals) and then active ingestion (Xi) (88.3% of those that exhibit waveform X). The xylem was reached after an average of 2.2 probes. The mean time to contact the xylem (X) and initiate ingestion (Xi) after onset of the first probe was 27.8 and 34.2 min, respectively. However, sustained xylem ingestion (Xi > 5 min) was established only after 39.8 min, on average. In a second study, the waveforms S, X and Xi were correlated with *X. fastidiosa* acquisition and inoculation in citrus. Acquisition of *X. fastidiosa* from infected plants occurred only after onset of the pathogen to 7.7% of test plants. In healthy plants, inoculation took place during waveform Xi (xylem ingestion); but with just 1 h in Xi, *B. xanthophis* subsequently transmitted waveforms S (salivary sheath formation and stylet pathway), S+X (X= first xylem contact by stylets) and S+X+Xi, with efficiencies of 3.5, 7.1 and 7.4%, respectively. Although higher transmission rates were recorded after the first contact with xylem (S+X and S+X+Xi), it is intriguing the fact that inoculation of this xylem-limited bacterium also occurred before that (during S). Finally, the effect of *X. fastidiosa* infection on the feeding behavior of *B. xanthophis* was studied by comparing stylet penetration on: a) healthy citrus; b) symptomless infected citrus; c) infected citrus with CVC symptoms. Based on the analysis of 26 EPG parameters, no significant differences were found in stylet penetration on healthy versus asymptomatic infected citrus. Symptomatic infection did not affect the ability of *B. xanthophis* to locate xylem vessels, but reduced the time spend by this vector ingesting xylem sap. These results suggest that *X. fastidiosa* acquisition may be more efficient on symptomless infected plants than on citrus with severe CVC symptoms. Information on vector feeding behavior is basic for future studies on transmission mechanisms of *X. fastidiosa* and to establish control strategies aimed to interfere with this process.

Key words: CVC, phytopathogenic bacterium, insect vector, feeding behavior

1 INTRODUÇÃO

A citricultura no Brasil exerce um papel de grande importância econômica e social, gerando empregos, renda, ocupação de terra e desenvolvimento de outros setores da economia. Na safra de 2006, o Brasil obteve uma produção de 17.868.175 toneladas de frutos destacando-se como maior produtor mundial, sendo o Estado de São Paulo o maior produtor nacional com 80,50% (FNP, 2007).

O crescimento da citricultura é afetado por várias doenças, sendo que uma delas tornou-se um dos mais sérios problemas no Brasil a partir de sua descoberta no final da década de 80. Devido aos sintomas de clorose na face superior das folhas, esta doença foi chamada de Clorose Variegada dos Citros (CVC) (ROSSETTI et al., 1990), sendo causada por uma bactéria gram-negativa, limitada aos vasos do xilema das plantas, com forma de bastonete e parede celular enrugada, denominada *Xylella fastidiosa* Wells et al. (LEE et al., 1993). As plantas atacadas apresentam sintomas foliares, nas quais são observadas manchas cloróticas na face superior, correspondendo a bolhosidades cor de palha na face inferior (ROSSETTI et al., 1991). Com a evolução da doença, os ramos mais afetados apresentam frutos de tamanho reduzido, com a casca endurecida, amarelecimento precoce e um elevado teor de açúcar (LEE et al., 1993). A CVC está presente nas principais regiões citrícolas do Brasil. Apenas no Estado de São Paulo, afeta 43% das plantas de laranja doce, ocasionando perdas de produção estimadas em US\$ 100 milhões por ano (LOPES et al., 2004). Por esta razão, atualmente esta doença é considerada um dos principais problemas da citricultura paulista.

Essa bactéria, que também infecta videira, ameixeira, pessegueiro, amendoeira, cafeeiro, entre outras plantas cultivadas, é transmitida por cigarrinhas das famílias Cicadellidae (subfamília Cicadellinae) e Cercopidae que necessariamente alimentam-se nos vasos do xilema. Estudos de transmissão identificaram até o momento 12 espécies de cigarrinhas vetoras da bactéria em citros (REDAK, 2004; YAMAMOTO et al., 2007). Entre estas, *Bucephalogonia xanthophis* (Berg) destaca-se por ser freqüentemente observada em pomares cítricos em formação (YAMAMOTO et al., 2001).

A disseminação da CVC nos pomares tem ocorrido principalmente pela ação dos insetos vetores a partir de mudas ou árvores cítricas infectadas (LOPES, 1999). O controle químico das cigarrinhas vem sendo utilizado visando a redução da população dos vetores e com isso diminuir a

dispersão da doença em viveiros e pomares cítricos (GRAVENA et al., 1997). A utilização de inseticidas sistêmicos, aplicados via tronco, vem sendo estudada e mostra-se uma opção eficiente e seletiva para o controle de cigarrinhas (YAMAMOTO et al., 2000). Entretanto, grande parte do controle ainda é realizado através de pulverizações sistemáticas de inseticidas de amplo espectro de ação, colocando em risco o manejo integrado de pragas de citros. Este tipo de controle tem sido dificultado, devido ao reaparecimento das cigarrinhas em pomares cítricos poucos dias ou semanas após as pulverizações com inseticidas (ROBERTO et al., 2000).

Por meio de estudos de microscopia ótica e eletrônica, verificou-se que as células de *X. fastidiosa* concentram-se em placas em alguns locais específicos. Em *Graphocephala atropunctata* (Signoret), a bactéria foi observada aderida ao forro cuticular do cibário (câmara de sucção) e na porção anterior do esôfago (PURCELL et al., 1979). Contudo, as bactérias que efetivamente são inoculadas na planta durante alimentação são as que estão localizadas no canal do precibário (ALMEIDA; PURCELL, 2006). O mecanismo de inoculação de *X. fastidiosa* por cigarrinhas ainda não foi completamente desvendado, embora existam algumas hipóteses que tentam explicar este mecanismo (LOPES, 1999). Uma hipótese é que a tensão negativa no xilema seria capaz de deslocar células da bactéria presente no canal alimentar do vetor em direção a planta (PURCELL, 1989). Entretanto, Almeida et al. (2005) observaram que *Homalodisca coagulata* (Say) é capaz de inocular *X. fastidiosa* em plantas dormentes de videira com pressão positiva no xilema, sugerindo que este fato representa uma evidência indireta da existência de um comportamento alimentar do vetor que promove ativamente o deslocamento da bactéria do estomodeu do inseto para planta. Sabe-se que a eficiência de um vetor pode variar dependendo de sua afinidade com a planta hospedeira. *G. atropunctata*, apesar de ser um eficiente vetor em videira, transmite *X. fastidiosa* (PD) com baixa eficiência para hospedeiros herbáceos como alfafa, por ter preferência por plantas perenes arbóreas (PURCELL, 1979). A eficiência de um vetor parece depender, pelo menos parcialmente, da frequência com que o inseto atinge o xilema em diferentes espécies de plantas, bem como do tempo gasto e modo de alimentação nos tecidos suscetíveis. O local preferido de alimentação na planta cítrica (ramos ou folhas) pode influenciar a eficiência com que diferentes espécies de cigarrinhas adquirem ou inoculam *X. fastidiosa* (LOPES, 1996; MARUCCI et al., 2004). O nível de infecção por *X. fastidiosa* também influencia a preferência hospedeira e a taxa de ingestão de líquidos por cigarrinhas vetoras, podendo,

portanto, ter efeitos sobre a eficiência de aquisição e/ou inoculação da bactéria (MARUCCI et al., 2005).

A partir de 1964, com a introdução da técnica de monitoramento eletrônico do comportamento alimentar (MCLEAN; KINSEY, 1964), muitas questões relacionadas à alimentação de insetos fitófagos sugadores foram melhor compreendidas. O sistema original desenvolvido por McLean e Kinsey utilizava corrente alternada (AC). Posteriormente, Tjallingii (1978) desenvolveu um sistema usando corrente direta (DC) e criou o termo “Electrical Penetration Graph” (EPG). Ambos os sistemas (AC e DC) medem a mudança de condutibilidade elétrica ou componente de resistência (R), entretanto, o sistema DC além de aferir a resistência também mede as mudanças de voltagem geradas na interação inseto-planta (força eletromotriz - emf). Basicamente a técnica consiste em estabelecer um circuito elétrico no qual o inseto e a planta fazem parte. Uma voltagem constante é aplicada no sistema e o circuito é fechado quando o inseto introduz os estiletes na planta. Em função das atividades estiletares realizadas, ocorrem alterações na voltagem do sistema devido a componentes de resistência (R) e de força eletromotriz (emf). Os sinais elétricos gerados (ondas) são amplificados e registrados em um gráfico. Atividades estiletares específicas (salivação, ingestão, penetração de protoplasma, etc) podem ser relacionadas com padrões de onda característicos (frequência e amplitude) (Tjallingii, 1988).

Através desta técnica, pôde-se caracterizar o comportamento alimentar de mais de 50 espécies de hemípteros (BACKUS, 1994). Os afídeos, por serem pragas de diversas culturas de importância econômica, foram escolhidos como os pioneiros nos estudos onde se empregou a técnica de EPG (MCLEAN; KINSEY, 1964). A utilização de padrões de EPG, correlacionando com cortes histológicos do local de alimentação (visualização da bainha salivar) e análise do “honeydew” (ANDERSEN; BRODBECK; MIZEL, 1989; BACKUS; HUNTER; ARNE, 1988) possibilitou grandes avanços nos estudos de comportamento alimentar de insetos sugadores.

Em Auchenorrhyncha, os estudos com EPG estão mais avançados com cigarrinhas que se alimentam preferencialmente no floema. Neste grupo, muitas espécies já tiveram seu comportamento alimentar caracterizado, e as informações obtidas utilizadas em trabalhos de resistência de plantas à insetos (RAPUSAS; HEINRICHS, 1990; CALDERON; BACKUS, 1992; MESFIN; HOLLANDER; MARKHAM, 1995) e transmissão de vírus (WAYADANDE; NAULT, 1993). Estes autores estudaram um grupo de 10 espécies de cigarrinhas (Hemiptera: Deltocephalinae) composto por espécies vetoras e não vetoras de “maize chlorotic dwarf vírus”.

Todas estas espécies, durante sua alimentação, apresentam um padrão denominado de “x-waveform”. Entre as espécies vetoras este padrão foi semelhante, porém diferente do observado para as não vetoras. Isto mostra que, mesmo em grupos próximos (mesma sub-família), uma pequena diferença no comportamento alimentar pode capacitar ou não espécies a transmitirem vírus.

Nesta última década, os estudos de comportamento alimentar com cigarrinhas que se alimentam preferencialmente no xilema (Cicadellinae) receberam uma maior ênfase. Isto se deve ao aumento da importância de doenças causadas por *X. fastidiosa* em plantas cultivadas, principalmente em videira (USA) e citros (Brasil) (HOPKINS; PURCELL, 2002). Entretanto, estes estudos ainda são bastante limitados, e apenas duas espécies de cigarrinhas vetoras de *X. fastidiosa* em videira, tiveram seu comportamento alimentar caracterizado através da técnica de EPG (ALMEIDA; BACKUS, 2004; BACKUS et al., 2005). Nestes estudos, os padrões de alimentação foram descritos usando o sistema AC e são importantes para a compreensão dos mecanismos de transmissão de *X. fastidiosa* em videira.

Apesar da relevância das cigarrinhas como vetoras de *X. fastidiosa*, pouco se sabe sobre seu comportamento alimentar em citros e atividades estiletares necessárias para a aquisição e inoculação da bactéria. E conseqüentemente, a eficácia de inseticidas sistêmicos para impedir a transmissão da bactéria não é bem conhecida, pois não se sabe ao certo quanto tempo é necessário para que o inseto atinja o sistema vascular e inocule a bactéria. Portanto, este trabalho tem como objetivos: caracterizar o comportamento alimentar de *B. xanthophis*, determinando seus principais padrões de EPG sistema DC e a relação destes com a localização dos estiletes dentro do tecido da planta; correlacionar a atividade estiletar do vetor com os processos de aquisição e inoculação de *X. fastidiosa* em plantas de citros e conhecer o comportamento deste vetor em plantas cítricas infectadas com a bactéria.

Referências

ALMEIDA, R.P.P.; BACKUS, E. A. Stylet penetration behaviors of *Graphocephala atropunctata* (Signoret) (Hemiptera, Cicadellidae): EPG waveform characterization and quantification. **Annals of the Entomological Society of America**, College Park, v. 97, n.4, p. 838-851, 2004.

ALMEIDA, R.P.P.; WISTROM, C.; HILL, B.L.; HASHIM, J.; PURCELL, A.H. Vector Transmission of *Xylella fastidiosa* to Dormant Grape. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 89, p. 419-424, 2005.

ALMEIDA, R.P.P.; PURCELL, A. H. Patterns of *Xylella fastidiosa* Colonization on the Precibarium of Sharpshooter Vectors Relative to Transmission to Plants. **Annals of the Entomological Society of America**, College Park, v. 99, p. 884-890, 2006.

ANDERSEN, P.C.; BRODBECK, B.V.; MIZEL III, R.F. Metabolism of amino acids, organic acids and sugars extracted from the xylem fluid of four host plants by adult *Homalodisca coagulata*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Dordrecht, v. 50, p. 149-160, 1989.

BACKUS, E.A. History, development and applications of the electronic insect feeding monitor. In: ELLSBURY, M.M.; BACKUS, E.A.; ULMAN, D.L. (Ed.). **History, development and application of AC electronic insect feeding monitors**. Thomas Say Publications in Entomology: Proceedings. Entomological Society of America, Lanham, MD. 1994. p.1-15.

BACKUS, E.A.; HUNTER, W.B.; ARNE, C.N. Technique for staining leafhopper (Homoptera: Cicadellidae) salivary sheaths and eggs within unsectioned plant tissue. **Journal Economic Entomology**, Lanham, v. 81, p. 1819-1823, 1988.

BACKUS, E.A.; HABIBI, J.; YAN, F.; ELLERSIECK, M. Stylet penetration by adult *Homalodisca coagulata* on grape: Electrical penetration graph waveform characterization, tissue correlation, and possible implications for transmission of *Xylella fastidiosa*. **Annals of the Entomological Society of America**, College Park, v. 98, p. 787-813, 2005.

FNP CONSULTORIA & COMÉRCIO. **Agrianual 2007**: anuário da agricultura brasileira. São Paulo, 2007. p. 257-300: citrus.

GRAVENA, S.; LOPES, J.R.S.; PAIVA, P.E.B.; YAMAMOTO, P.T.; ROBERTO, S.R. Os vetores da *Xylella fastidiosa*. In: DONADIO, L.C.; MOREIRA, C. S. (Ed.). **Clorose variegada dos citros**. Bebedouro: Fundecitrus, 1997. cap.3, p.37-53.

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, p. 1056-1066, 2002.

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 the causal agent. **Summa Phytopathologica**, Jaguariuna, v.19, n. 2, p. 123-125, 1993.

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

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

LOPES, S.A.; LARANJEIRA, F.F.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A. Clorose Variegada: perdas anuais de US\$ 100 milhões. **Visão Agrícola**, Piracicaba, v. 2, p. 20-23, 2004.

MARUCCI, R.C.; LOPES, J.R.S.; VENDRAMIM, 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. 759-768, 2004.

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

McLEAN, D.L.; KINSEY, M.G. A technique for electronically recording aphid feeding and salivation. **Nature**, London, v. 203, p. 1358-1359, 1964.

MESFIN, T.; HOLLANDER, J. D.; MARKHAM, P. G. Feeding activities of *Cicadulina mbila* (Hemiptera: Cicadellidae) on host-plants. **Bulletin of Entomological Research**, Farnham Royal, v. 85, p. 387-396, 1995.

PRADO, E.; TJALLINGII, W.F. Aphid activities during sieve element punctures. **Entomological Experimentalis et Applicata**, Dordrecht, v. 72, p. 157-165, 1994.

PURCELL, A.H. Leafhopper vectors of xylem-borne plant pathogens. In: MARAMOROSCH, K.; HARRIS, K. F. (Ed.). **Leafhopper vectors and plant disease agents**. New York: Academic Press, 1979. cap.19 p. 603-625.

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

RAPUSAS, H. R.; HEINRICHS, E. A. Feeding behaviour of *Nephotettix virescens* (Homoptera: Cicadellidae) on rice varieties with different levels of resistance. **Environmental Entomology**, College Park, v. 19, p. 594-602, 1990.

REDAK, R.A.; PURCELL, A.H.; LOPES, J.R.S.; BLUA, M.J., MIZELL, 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**, Stanford, 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.

ROSSETTI, V. Clorose Variegada dos Citros (CVC). In: RODRIGUEZ, O.; VIEGAS, F. **Citricultura brasileira**. 2.ed. Campinas: Fundação Cargill, 1991. v. 2 p. 714-721.

ROSSETTI, V.; DE NEGRI, D. Clorose variegada dos citros (CVC): revisão. **Laranja**, Cordeirópolis, v. 11, n. 1, p. 1-14, 1990.

TJALLINGII, W.F. Electronic recording of penetration behavior by aphids. **Entomological Experimentalis et Applicata**, Dordrecht, v. 24, n. 3, p. 721-730, 1978.

TJALLINGII, W.F.; HOGEN ESCH, T.H. Fine structure of aphid stylet routes in plant tissues in correlation with EPG signals. **Physiological Entomology**, Oxford, v. 18, p. 317-328, 1993.

WAYADANDE, A. C.; NAULT, L. R. Leafhopper probing behaviour associated with maize chlorotic dwarf virus transmission to maize. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 83, p. 522-526, 1993.

YAMAMOTO, P.T.; GRAVENA, S. Espécies e abundância de cigarrinhas e psilídeos (Homoptera) em pomares cítricos. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Jaboticabal, . v.29, n. 1, p. 169-176, 2000.

YAMAMOTO, P.T.; PRIA JR.; W.D.; ROBERTO, S.R.; FELIPPE, 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.; 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, p. 266, 2007.

2 LOCAIS E PERÍODO DE ALIMENTAÇÃO DA CIGARRINHA VETORA DE *Xylella fastidiosa*, *Bucephalogonia xanthophis* (BERG) (HEMIPTERA: CICADELLIDAE), EM MUDAS CÍTRICAS

Resumo

O estudo do comportamento alimentar de cigarrinhas vetoras da bactéria *Xylella fastidiosa* é necessário para entender o processo de transmissão deste patógeno em citros. Este trabalho teve como objetivo identificar o local preferido de alimentação e o período de maior atividade alimentar em mudas de laranja-doce [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck] pelo vetor *Bucephalogonia xanthophis* (Berg) (Hemiptera: Cicadellidae). O local de alimentação foi estudado em ensaio de livre escolha, no qual 30 insetos adultos foram liberados em câmaras de observação (n = 10) contendo uma muda cítrica. Após 1, 15, 21, 25, 39, 45, e 49 h da liberação, registrou-se o número de insetos na parte superior (formada por três ramos secundários em brotações) e inferior (haste principal com ≈40 cm de altura) da muda cítrica. Nos ramos da parte superior, avaliou-se a preferência entre a haste, pecíolo e limbo foliar. Em um segundo ensaio, 10 machos e 10 fêmeas de *B. xanthophis* foram confinados individualmente sobre a haste de brotações de mudas cítricas para determinar os períodos de alimentação, quantificando-se a excreção de “honeydew” (medida indireta da ingestão) em períodos sucessivos de dia e noite, durante 48 h. *B. xanthophis* mostrou preferência pela haste dos ramos novos, na parte superior da muda cítrica. Esta cigarrinha ingeriu seiva do xilema e apresentou maior volume médio de excreção e maior percentual de indivíduos que excretaram durante a fotofase, não havendo diferença entre sexos. Assim, estudos detalhados de comportamento alimentar de *B. xanthophis* em relação à transmissão de *X. fastidiosa* devem ser realizados na haste de brotações cítricas, durante a fotofase. Sugere-se, ainda, que a inspeção visual desta cigarrinha em pomares novos, para fins de manejo, seja feito na haste dos ramos em brotação.

Palavra-chave: Cicadellinae; Comportamento alimentar; Clorose variegada dos citros

Abstract

The study of feeding behavior of *Xylella fastidiosa* vectors is necessary to understand transmission of this pathogen in citrus. This study was aimed to identify preferred feeding sites and periods of the sharpshooter vector, *Bucephalogonia xanthophis* (Berg) (Hemiptera: Cicadellidae), on sweet orange nursery trees [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck]. The feeding sites were determined in a choice experiment, in which 30 adults were released inside observation chambers (n = 10) containing a citrus plant. At 1, 15, 21, 25, 39, 45, e 49 h after the release, the number of insects on the upper (secondary stems and leaves) and bottom (primary stem, up to 40 cm above soil) parts of the plant was recorded. To determine the feeding periods, 10 males and 10 females of *B. xanthophis* were individually confined on the secondary stems of citrus plants, and the honeydew excretion (indirect measure of ingestion) was quantified for 48 h, during periods of light and dark. Most individuals (91%) of *B. xanthophis* were observed on the upper part of the plant, mainly on the secondary stems (62%). A larger volume of honeydew excretion and higher proportion of excreting individuals were observed during the photophase for both males and

females, indicating that daytime is a preferred feeding period for this vector. Excretion rates did not vary between sexes. These results indicate that visual inspections for monitoring *B. xanthophis* in citrus groves as well as advanced studies on its feeding behavior in relation to transmission of *X. fastidiosa* should be done on the stems of secondary stems, during the phophase.

Keywords: Cicadellinae; Feeding behavior; Citrus variegated chlorosis

2.1 Introdução

X. fastidiosa é uma bactéria que se multiplica no xilema de plantas, causando doenças em diversas culturas de importância econômica (PURCELL e HOPKINS, 1996). No Brasil, é o agente causal da Clorose variegada dos citros (CVC), doença que afeta laranja-doce [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck] e que se caracteriza por sintomas de clorose na face superior das folhas e drástica redução no tamanho dos frutos (ROSSETTI et al., 1990; LEE et al., 1993). Este patógeno é transmitido por cigarrinhas das famílias Cicadellidae (subfamília Cicadellinae) e Cercopidae, que têm sua alimentação localizada no xilema das plantas (PURCELL, 1989). Em citros já foram identificadas várias espécies de cigarrinhas vetoras, sendo todas representantes de Cicadellinae (REDAK et al., 2004).

A disseminação da CVC nos pomares tem ocorrido principalmente pela ação dos insetos vetores a partir de mudas ou árvores cítricas infectadas (LOPES, 1999). Dentre as cigarrinhas identificadas como vetoras, *Bucephalogonia xanthophis* (Berg) destaca-se por ser frequentemente observada em viveiros abertos (ROBERTO et al., 2000) e pomares cítricos em formação (YAMAMOTO et al., 2001).

As cigarrinhas vetoras de *X. fastidiosa* em citros apresentam uma baixa eficiência de transmissão quando comparadas aos vetores da estirpe de videira (LOPES, 1999). Este fato pode estar relacionado com uma baixa concentração da bactéria em citros (ALMEIDA et al., 2001) e uma irregular distribuição de *X. fastidiosa* nas plantas hospedeiras (MIZUBUTI et al., 1994), o que pode reduzir a eficiência de aquisição pelas cigarrinhas. Alternativamente, pode ocorrer uma baixa taxa de sobrevivência de infecções iniciais de *X. fastidiosa* em citros, após sua inoculação por vetores (LOPES, 1999).

Aspectos relacionados à interação inseto-plantas também podem influenciar na eficiência de transmissão. O local de alimentação na planta (LOPES, 1996), a baixa taxa de ingestão

observada em citros em relação a outras plantas hospedeiras (MILANEZ et al., 2003) e as condições hídricas do solo que influenciam na sobrevivência e alimentação da cigarrinha na planta hospedeira (PEREIRA et al., 2005), possivelmente afetam a eficiência com que diferentes espécies de cigarrinhas adquirem ou inoculam *X. fastidiosa*.

Como a distribuição de *X. fastidiosa* é desuniforme na planta cítrica (QUEIROZ-VOLTAN; PARADELA FILHO, 1999), o local de alimentação do vetor é uma dos principais fatores que podem influenciar a probabilidade de aquisição ou inoculação do patógeno. Cada espécie vetora tem preferência por determinadas partes da planta cítrica (GRAVENA et al., 1997). Para algumas espécies, o local de preferência e a atividade alimentar podem variar de acordo com o período do dia (MARUCCI et al., 2004; MONTESINO et al., 2006).

Conhecer as características do comportamento alimentar de cigarrinhas vetoras de *X. fastidiosa* em citros é importante para melhor compreender o processo de transmissão deste patógeno e definir táticas de controle mais eficientes que possam ser implementadas no manejo da CVC. Devido à ausência destas informações para *B. xanthophis*, este trabalho teve como objetivo determinar o local preferido de alimentação e o período de maior atividade alimentar desta cigarrinha em mudas cítricas.

2.2 Desenvolvimento

2.2.1 Material e Métodos

Obtenção de cigarrinhas e plantas teste

A cigarrinha *B. xanthophis* foi criada em plantas de *Vernonia condensata* Baker conforme descrito por Marucci et al (2003), de modo a obter adultos sadios e com idade padronizada. Para o estudo de seleção do local de alimentação, usaram-se mudas padrão comercial de laranja-doce [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck], cv. Pêra, enxertadas sobre citrumelo Swingle [*Citrus paradisi* Macf. x *Poncirus trifoliata* (L.) Raf.]. No estudo de horário de alimentação, utilizaram-se “seedlings” de laranja-doce, cv. Pêra, obtidas a partir de sementes. Os dois tipos de mudas foram produzidas em viveiros telados, em vasos de 4 L com substrato comercial Plantmax® sendo adubadas periodicamente com o fertilizante de liberação lenta Osmocoat® (22-04-08).

Seleção do local de alimentação na planta cítrica

Em um experimento de livre escolha, avaliou-se a preferência da cigarrinha por duas partes principais da muda cítrica: a) superior (ou copa), formada por três ramos secundários (brotações) com cerca de 20 cm cada; e b) inferior, constituída pela haste principal (enxerto + porta-enxerto) com, aproximadamente, 40 cm de altura. Nos ramos da parte superior da muda, avaliou-se a preferência entre a haste, pecíolos e limbos foliares. Utilizaram-se câmaras de observação (base de 63x63 cm e 120 cm de altura) com estrutura de madeira e revestidas com acrílico transparente e tela antiafídica, descritas por Marucci et al. (2004). O experimento foi composto por 10 repetições, sendo cada uma constituída por uma câmara de observação contendo uma muda cítrica, no interior da qual foram liberadas 30 cigarrinhas adultas (machos e fêmeas) com 7-14 dias de idade. A liberação dos insetos foi feita no final da tarde (17:00 h) e as avaliações foram realizadas após 1 (18:00 h), 15 (8:00 h), 21 (14:00 h), 25 (18:00 h), 39 (8:00 h), 45 (14:00 h) e 49 (18:00 h) h, registrando-se o número de insetos em cada parte da planta.

Determinação do período de maior atividade alimentar

A atividade alimentar de *B. xanthophis* foi avaliada nos períodos diurno (fotofase) e noturno (escotofase), por meio da quantificação e análise da excreção de “honeydew”. O volume de ‘honeydew’ excretado por unidade de tempo foi usado como medida indireta da taxa de ingestão. Neste ensaio utilizaram-se adultos (machos e fêmeas) com idade de 5-8 dias após emergência, sendo os mesmos retirados da criação e colocados para aclimação em plantas cítricas por 24 h. Vinte cigarrinhas de cada sexo foram confinadas individualmente sobre ramos das mudas cítricas (1 cigarrinha/planta), utilizando-se uma gaiola plástica (tubo Falcon de 50 mL) acoplada a um reservatório graduado na parte inferior (tubo Falcon de 15 mL) (Andersen et al., 1992). As gaiolas foram posicionadas sobre o ramo de modo a favorecer o escoamento do líquido para o recipiente graduado, permitindo a quantificação direta da excreção. O ensaio foi instalado no final da tarde (18:00 h) em uma sala climatizada ($25 \pm 2^\circ\text{C}$; fotofase de 12 h) e avaliado em períodos de 12 h até completar 48 h, registrando-se o volume excretado em cada período.

Baseando-se na análise química do “honeydew” (aminoácidos ou pH) de insetos sugadores, pode-se inferir o local (floema ou xilema) de alimentação dos mesmos (Walker, 2000). Assim, para determinar o tecido de alimentação de *B. xanthophis* na fotofase e escotofase, amostras do “honeydew” de 5 machos e 5 fêmeas por período foram submetidas à análise de pH

em papel indicador (Universalindikator pH, Merck) e de presença de aminoácidos em teste de reação com nihidrina (0,1%).

Análise dos dados

No experimento de seleção dos locais de alimentação, utilizaram-se os testes não paramétricos de Mann-Whitney e Behrens-Fisher para verificar a preferência dos indivíduos entre as partes superior e inferior da planta e entre partes dos ramos superiores (haste x pecíolo x limbo foliar), respectivamente. Considerou-se, como variável, o número acumulado de indivíduos registrados em todas as avaliações. Realizaram-se, também, análises de regressão para verificar a relação entre posição dos insetos na planta e tempo após a liberação na câmara de observação. Para detectar diferenças no número dos insetos presentes em certas partes da planta entre períodos de avaliação, utilizou-se o teste de Steel.

No experimento de excreção de “honeydew”, comparou-se o volume médio excretado pelas cigarrinhas entre os períodos de fotofase e escotofase pelo teste não paramétrico de sinais de Wilcoxon, e entre machos e fêmeas pelo teste de Wilcoxon. Os testes de McNemar e de Qui-Quadrado foram usados para comparar a proporção de insetos que excretam na fotofase *versus* escotofase e entre machos e fêmeas, respectivamente. Todas as análises foram realizadas com o programa R (<http://www.R-project.org>).

2.2.2 Resultados e Discussão

Os resultados deste trabalho mostram que a cigarrinha *B. xanthophis* apresenta um local e período preferido para alimentação em mudas cítricas, comportamento este que possivelmente influencia a eficiência de transmissão de *X. fastidiosa* e tem implicações no manejo deste inseto vetor em pomares cítricos. No estudo de seleção do local de alimentação, *B. xanthophis* mostrou nítida preferência pela parte superior da muda cítrica ($P < 0,01$) (Figura 1A), que é composta por ramos novos. Neste local da planta, houve diferença significativa na ocorrência de indivíduos entre as partes do ramos ($P < 0,01$), com predominância na haste (62%) seguida pelo limbo foliar (28%) e pecíolos (10%) (Figura 1B).

A preferência de *B. xanthophis* pela parte superior da planta se deve provavelmente à ocorrência de ramos novos. Marucci et al. (2004) mostraram que duas outras cigarrinhas vetorais em citros, *Dilobopterus costalimai* Young e *Oncometopia facialis* (Signoret), têm uma nítida preferência por brotações. Árvores cítricas jovens apresentam brotações mais vigorosas, maiores

concentrações de aminoácidos na seiva do xilema e maior abundância da cigarrinha *Homalodisca vitripennis* (Germar) em relação a árvores mais velhas (BI et al., 2007). Os níveis de aminoácidos presentes na seiva do xilema representam um dos principais fatores que influenciam na seleção de plantas hospedeiras por cigarrinhas (BRODBECK et al., 1990; ANDERSEN et al., 2005). Assim, o fato de *B. xanthophis* preferir os ramos novos em mudas cítricas explicaria pelo menos em parte sua abundância em viveiros cítricos abertos (ROBERTO et al., 2000) e pomares em formação (YAMAMOTO et al., 2001), que geralmente apresentam maior fluxo de crescimento.

Embora haja uma preferência das cigarrinhas por ramos novos na planta cítrica, existe variabilidade entre as espécies com relação aos locais de alimentação nas brotações. Observações em campo indicaram que a espécie *Acrogonia terminalis* Young, por exemplo, prefere alimentar-se nas folhas novas, enquanto que *D. costalimai* prefere a haste das brotações novas e *Oncometopia* sp. é observada na haste de brotações mais desenvolvidas, principalmente naquelas que o ramo estão em posição vertical (GRAVENA et al., 1997). Em ensaios de livre escolha realizados em laboratório, Marucci et al. (2004) observaram que a maioria dos adultos de *D. costalimai* inicialmente pousa sobre as folhas de mudas cítricas, passando posteriormente para a haste dos ramos secundários (brotações). Para *O. facialis* (Signoret) não há diferença na preferência para pouso entre folhas e hastes, sendo o local de alimentação variável de acordo com o horário do dia (MARUCCI et al., 2004).

No presente estudo, observou-se que maioria dos indivíduos de *B. xanthophis* encontravam-se nas folhas (limbo foliar e pecíolos) da parte superior da planta na primeira avaliação, com apenas 1 h após a liberação (Figura 2). Entretanto, ao longo do tempo observou-se uma tendência crescente na porcentagem de cigarrinhas na haste dos ramos ($R^2 = 0,77$), coincidindo com uma tendência inversa para os que estavam nas folhas ($R^2 = 0,77$) (Figura 2). A partir da terceira avaliação (21 h após a liberação), observou-se um aumento significativo (teste de Steel; $P=0,0097$) na porcentagem de cigarrinhas na haste, em relação às duas primeiras avaliações do ensaio. Após 25 h, a maioria dos indivíduos ($\approx 70\%$) já estavam localizados na haste (Figura 2). Este comportamento de pouso inicial sobre as folhas e posterior movimentação para a haste dos ramos novos da planta cítrica é semelhante ao relatado para a cigarrinha *D. costalimai* (MARUCCI et al., 2004). Entretanto, no caso de *D. costalimai*, Marucci et al. (2004) constataram que a nervura secundária das folhas foi o local preferido de permanência (seguido da haste dos

ramos) ao longo de 48 h de observações, em um ensaio de livre escolha semelhante ao realizado na presente pesquisa.

Tem sido postulado que a eficiência de aquisição de *X. fastidiosa* possa estar condicionada ao local de preferência de alimentação do vetor na planta infectada, sendo maior em locais de maior concentração da bactéria (LOPES, 1996; MARUCCI et al., 2004). Estudando a distribuição de *X. fastidiosa* em citros, Queiroz-Voltan & Paradella Filho (1999) observaram que a obstrução dos vasos do xilema diminui das folhas para a haste, o que sugere uma maior concentração bacteriana nas folhas cítricas. O fato de *D. costalimai* permanecer por mais tempo sobre folhas cítricas do que *O. facialis* foi apontado por Marucci et al. (2004) como um dos possíveis fatores explicando a maior eficiência de transmissão do patógeno pela primeira espécie de cigarrinha. Entretanto, um estudo recente mostrou não haver diferença significativa em eficiência de transmissão entre *D. costalimai* e *B. xanthophis* em citros (MARUCCI, 2003), a despeito da segunda espécie ter preferência pela haste da planta cítrica. Assim, embora a haste apresente uma menor porcentagem de vasos colonizados por *X. fastidiosa* do que as folhas em citros (QUEIROZ-VOLTAN E PARADELLA FILHO, 1999), ela provavelmente representa um importante local de aquisição e/ou inoculação desta bactéria por *B. xanthophis*.

No experimento de excreção de “honeydew”, machos e fêmeas de *B. xanthophis* não diferiram estatisticamente entre si quanto ao volume médio excretado ($P = 0,76$) e porcentagem de indivíduos que excretaram ($\chi^2=1,11$; $P = 0,29$). Para ambos os sexos, verificou-se um maior volume de excreção ($P = 0,002$) e maior porcentagem de insetos excretando durante o dia em relação à noite ($\chi^2=10,8$; $P = 0,001$) (Figura 3). Estes resultados são semelhantes aos relatados por Montesino et al. (2006) para as cigarrinhas *D. costalimai* e *O. facialis*, que também apresentaram maior taxa de excreção durante o dia em ramos de laranjeiras ‘Pêra’ e ‘Valência’.

Cigarrinhas da subfamília Cicadellinae podem sincronizar sua atividade alimentar de acordo com a flutuação química da seiva do xilema. *H. coagulata*, *Holamodisca insolita* (Wlk.) e *Cuerna costalis* (F.) se alimentam mais ativamente sobre *Catharanthus roseus* (L.) durante a noite, quando a concentração de aminoácidos na seiva do xilema é 1,9 vezes maior que durante o dia (BRODBECK et al., 1993). Entretanto, em *Lagerstroemia indica* L. estas mesmas espécies se alimentam quase que exclusivamente durante o dia, período no qual a concentração de aminoácidos na seiva do xilema é 2,5 vezes maior em relação à noite (BRODBECK ET AL., 1993). Para citros, não há informações sobre variação diurna nos níveis de aminoácidos no

xilema, porém, baseando-se nos dados de taxa de excreção por cigarrinhas em diferentes períodos obtidos no presente estudo e por Montesino et al. (2006), é provável que a concentração de aminoácidos seja maior durante o dia. Contudo, seria necessária uma análise química detalhada da seiva do xilema de citros na fotofase e escotofase para comprovar esta hipótese.

Baseando-se nas análises de pH e de presença de aminoácidos, não houve diferenças no “honeydew” excretado por machos e fêmeas na fotofase e escotofase. Em todas as amostras examinadas, este apresentou um pH inferior a 7 e não ocorreu reação com ninhidrina, indicando que apresenta baixa concentração ou ausência de aminoácidos. O pH abaixo de 7 e a falta de níveis detectáveis de aminoácidos no “honeydew” são indicativos de ingestão no xilema, que apresenta pH entre 5,4-6,5 e baixa concentração de açúcares e aminoácidos (ANDERSEN et al., 1989; WALKER, 2000). Em contraste, o floema tem um pH entre 7,2-8,4 e é rico em compostos orgânicos (WALKER, 2000). Assim, estes resultados sugerem que adultos de *B. xanthophis* ingerem predominantemente conteúdos do xilema, independente do sexo ou período. Entretanto, para determinar precisamente os sítios de alimentação no interior da planta, são necessários estudos detalhados de atividade estiletar utilizando-se a técnica de “Electrical Penetration Graph” (EPG) (TJALLINGII, 1978), bem como análises histológicas do local da planta onde ocorreu a penetração estiletar.

Os resultados deste trabalho mostram que adultos de *B. xanthophis* preferem se alimentar na haste de ramos novos em mudas cítricas, não variando de local ao longo do dia. Assim, em pomares cítricos recém-implantados ou replantas, a inspeção e medidas de controle desta cigarrinha, devem ser direcionadas neste local da planta. Como a taxa de excreção representa uma medida indireta da ingestão de seiva, os resultados do experimento de excreção de “honeydew” demonstram uma maior atividade alimentar durante o dia para ambos os sexos de *B. xanthophis*. Estas informações também serão úteis para aprofundar os estudos de comportamento alimentar associados à transmissão de *X. fastidiosa*. Novos ensaios utilizando a técnica de EPG estão sendo conduzidos para caracterizar as atividades estiletas de *B. xanthophis* na haste de brotações cítricas durante o dia, e determinar sua relação com a aquisição e inoculação da bactéria.

Figura 1 - Distribuição de adultos de *Bucephalogonia xanthophis* em mudas de *Citrus sinensis*, em ensaio de livre escolha. A) Parte superior e inferior da planta; B) Haste, limbo foliar e pecíolo de ramos da parte superior da planta. Porcentagens seguidas da mesma letra, em um mesmo gráfico, não diferem entre si pelos testes de Mann-Whitney (A) e de Behrens-Fisher (B) ($P < 0,05$)

Figura 2 - Curvas de regressão logarítmica obtidas para a relação entre a porcentagem média de adultos de *Bucephalogonia xanthophis* na haste ou nas folhas (limbo foliar + pecíolo) de ramos de *Citrus sinensis* e o tempo após a liberação dos insetos, em ensaio de livre escolha

Figura 3 - Volume médio de excreção (linha) e porcentagem de indivíduos (colunas) de *Bucephalogonia xanthophis* que excretaram “honeydew” em períodos sucessivos de noite (12 h) e dia (12 h) sob confinamento em mudas de *Citrus sinensis*. Barras sobre a linha e colunas representam o erro padrão das médias, as quais foram calculadas agrupando-se os dados de machos e fêmeas

2.3 Conclusão

De acordo com os resultados deste trabalho:

- 1 - Adultos de *B. xanthophis* preferem se alimentar na haste de ramos novos em mudas cítricas.
- 2 - Machos e fêmeas não diferem quanto à taxa de ingestão de seiva do xilema.
- 3 - Ambos os sexos apresentam uma maior atividade alimentar durante o dia.

Referências

ALMEIDA, R.P.P.; PEREIRA, E.F.; PURCEL, 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, p.382-386, 2001.

ANDERSEN, P.C.; BRODBECK, B.V.; MIZELL III, R.F. Metabolism of amino acids and organic acids and sugars extracted from the xylem fluid of 4 host plants by *Homalodisca coagulata*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Dordrecht, v. 50, p.149-159, 1989.

ANDERSEN, P.C.; BRODBECK, B.V.; MIZELL III, R.F.; ODEN, S. Abundance and feeding of *Homalodisca coagulata* (Hemiptera: Cicadellidae) on *Vitis* genotypes in north Florida. **Environmental Entomology**, College Park, v. 34, p. 466-478, 2005.

ANDERSEN, P.C.; BRODBECK, B.V.; MIZELL III, R.F. Feeding by the leafhopper, *Homalodisca coagulata*, in relation to xylem fluid chemistry and tension. **Journal of Insect Physiology**, Oxford, v. 38, p. 611-622, 1992.

BI, J.L.; CASTLE, S.J.; TOSCANO N.C. Amino acid Fluctuations in young and old orange trees and their influence on glassy-winged sharpshooter (*Homalodisca vitripennis*) Population Densities. **Journal of Chemical Ecology**, Lexington, v. 33, p. 1692–1706, 2007.

BRODBECK, B.V.; MIZELL III, R.F.; FRENCH, W.J. Amino acids as determinants of host preference for the xylem feeding leafhopper, *Homalodisca coagulata* (Homoptera: Cicadellidae). **Oecologia**, Berlin, v. 83, p. 338-345, 1990.

BRODBECK, B.V.; MIZELL III, R.F.; ANDERSEN, P.C. Physiological and behavioral adaptations of three species of leafhoppers in response to the dilute nutrient content of xylem fluid. **Journal of Insect Physiology**, Oxford, v.39, p. 73-81, 1993.

GRAVENA, S.; LOPES, J.R.S.; PAIVA, P.E.B.; YAMAMOTO, P.T.; ROBERTO, S.R. Os vetores da *Xylella fastidiosa*. In: DONADIO, L.C.; MOREIRA, C. S. (Ed.). **Clorose variegada dos citros**. Bebedouro: Fundecitrus, 1997. cap. 3, p. 37-53.

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 the causal agent. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 19, p. 123-125, 1993.

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

LOPES, J.R.S. Estudos com vetores de *Xylella fastidiosa* e implicações no manejo da clorose variegada dos citros. **Laranja**, Cordeirópolis, v. 20, p. 329-344, 1999.

MARUCCI, R.C. **Eficiência de transmissão de *Xylella fastidiosa* por cigarrinhas (Hemiptera, Cicadellidae) em *Citrus sinensis* (L.) Osbeck e *Coffea arabica* L.** 2003. 139 p. Tese (Doutorado em Ciências – Área Entomologia). Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2003.

MARUCCI, R.C.; LOPES, J.R.S.; VENDRAMIM, J.D.; CORRENTE, J.E. Feeding site preference of *Dilobopterus costalimai* Young and *Oncometopia facialis* (Signoret) (Hemiptera: Cicadellidae) on citrus plants. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 33, p. 759-768, 2004.

MARUCCI, R.C.; GIUSTOLIN, T.A.; MIRANDA, M.P.; MIQUELOTE, M.; 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, p. 669-675, 2003.

MILANEZ, J.M.; PARRA, J.R.P.; CUSTODIO, I.A.; MAGRI, D.C. Feeding and survival of citrus sharpshooters (Hemiptera: Cicadellidae) on host plants. **Florida Entomologist**, Gainesville, v. 86, p. 154-157, 2003.

MIZUBUTI, E.S.G.; MATSUOKA, K.; PARIZZI, P. Associação de bactéria do tipo *Xylella* em laranjeiras com sintomas de clorose variegada na região da Zona da Mata de Minas Gerais. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.19, p.241-244, 1994.

MONTESINO, L.H. COELHO, J.H.C.; FELIPPE, M.R.; YAMAMOTO, P.T. Ingestão de seiva do xilema de laranjeiras ‘pêra’ e ‘valência’ (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) sadias e infectadas por *Xylella fastidiosa*, pelas cigarrinhas vetoras *Oncometopia facialis* e *Dilobopterus costalimai* (Hemiptera: Cicadellidae). **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 28, n. 2, p. 199-204, 2006.

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

PURCELL, A.H. Homopteran transmission of xylem-inhabiting bacteria. In: HARRIS, K.F. (Ed.). **Advances in Disease Vector Research**. New York: Springer-Verlag, 1989. p.243-266.

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

QUEIROZ-VOLTAN, R.B.; PARADELA FILHO, O. Caracterização de estruturas anatômicas de citros infectados com *Xylella fastidiosa*. **Laranja**, Cordeirópolis, v. 20, p. 55-76, 1999.

REDAK, R.A.; PURCELL, A.H.; LOPES, J.R.S.; BLUA, M.J.; MIZELL III, R.F.; ANDERSEN, P.C. The biology of xylem fluid – feeding insect vectors of *Xylella fastidiosa* and their relation to disease epidemiology. **Annual Review of Entomology**, Stanford, 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, p. 65-79, 2000.

ROSSETTI, V.; GARNIER, M.; BOVÉ, J.M.; BERETTA, M.J.G.; TEIXEIRA, A.R.; QUAGGIO, J.A.; DE NEGRI, J.D. **Présence de bactéries dans le xylème d’orangers atteints de chlorose variégée, une nouvelle maladie des agrumes au Brésil**. Comptes Rendus de l’Académie des Sciences. Series 3 Sciences de la Vie, v. 310, p. 345-349, 1990.

WALKER, G.P. A Beginner's Guide to Electronic Monitoring of Homopteran Probing Behavior. In: (Ed.). WALKER, G.P.; BACKUS, E.A. **Principles and Applications of Electronic Monitoring and Other Techniques in the Study of Homopteran Feeding Behavior**. Lanham: Thomas Say Publications in Entomology, 2000. p. 14-40.

TJALLINGII, W.F. Electronic recording of penetration behaviour by aphids. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Dordrecht, v. 24, p. 721-730, 1978.

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.

3 CARACTERIZAÇÃO DOS PADRÕES DE “ELECTRICAL PENETRATION GRAPHS” (EPG) DE *Bucephalogonia xanthophis* (BERG) (HEMIPTERA: CICADELLIDAE), VETOR DE *Xylella fastidiosa* EM CITROS

Resumo

A cigarrinha *Bucephalogonia xanthophis* (Berg) é vetora da bactéria *Xylella fastidiosa*, agente causal da Clorose Variegada dos Citros (CVC). Apesar da grande importância da CVC, o comportamento alimentar de seus vetores e suas implicações na transmissão de *X. fastidiosa*, não foi estudado. Neste trabalho o comportamento alimentar de *B. xanthophis* foi estudado por meio da técnica de “Electrical Penetration Graph” (EPG), sistema DC, sobre mudas cítricas [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck] cv. ‘Pêra’. Os padrões foram descritos de acordo com suas características de morfologia da onda, amplitude, frequência, nível de voltagem e origem elétrica. Os principais padrões foram correlacionados com técnicas de histologia e análise do honeydew para determinação da posição dos estiletes no tecido vegetal e significado biológico. Seis padrões foram descritos: (S) formação da bainha salivar e caminhamento intracelular; (R) estiletes inseridos na planta, porém aparentemente sem atividades; (X) contato dos estiletes com vasos do xilema; (Xi) ingestão ativa no xilema; (I) breve interrupção que ocorre durante X e Xi; (W) retirada dos estiletes da planta. *B. xanthophis* gasta 91.8% do tempo de prova em atividades no xilema, sendo a principal ingestão (Xi; 97.5%). Durante uma prova, a sequência de eventos com maior probabilidade de ocorrência foi: fase de caminhamento (S) através de células da epiderme e parênquima (100% dos indivíduos), seguido do contato com xilema (X) (67,6% de todos os indivíduos) e então ingestão ativa (Xi) (88,3% dos indivíduos que exibem o padrão X). O xilema foi encontrado após uma média de 2,2 provas, entretanto 50% dos indivíduos chegaram a este tecido logo na primeira prova. O tempo médio para encontrar o xilema (X) e começar a ingerir (Xi) foi de 27,8 e 34,2 min, respectivamente. Contudo, a ingestão contínua no xilema (Xi > 5 min) foi estabelecida após com um tempo médio de 39.8 min. Os resultados deste trabalho servirão de base para estudos de transmissão de *Xylella fastidiosa* em citros e desenvolvimento de táticas de manejo que possam interferir na transmissão desta bactéria.

Palavra-chave: Cicadellinae; Cigarrinhas vetoras; Comportamento alimentar; Clorose variegada dos citros

Abstract

The sharpshooter *Bucephalogonia xanthophis* (Berg) is a vector of the xylem-limited bacterium, *Xylella fastidiosa*, which causes citrus variegated chlorosis (CVC). Despite the importance of CVC, the feeding behavior of vectors on citrus and its implications on transmission of *X. fastidiosa* have not been studied. In this research we studied electrical penetration graph (EPG-DC system) waveforms performed by *B. xanthophis* on seedlings of *Citrus sinensis* (L.) Osbeck, and their relationships with stylet activities and xylem feeding. EPG waveforms were described based on amplitude, frequency, voltage level and electrical origin of the observed patterns during stylet penetration on plant tissues. The main waveforms observed during stylet penetration were correlated with histological observations of salivary sheaths in plant tissues and honeydew excretion analysis, in order to determine stylet activities and their precise position. Six waveforms and proposed activities are described: (S) secretion of salivary sheath and intracellular

pathway; (R) stylets inserted into the plant, without any apparent activity; (X) contact of stylets with xylem vessels; (Xi) active xylem ingestion; (I) interruption between X and Xi; and (W) stylet withdrawal from the plant. *B. xanthophis* spent 91.8% of its probing time in the xylem, where the main activity was ingestion (Xi; 97.5%). During a probe, the most likely sequence of events is stylet pathway (S) through epidermal and parenchymal cells (all individuals), followed by contact with xylem (X) (67.6% of all individuals) and then active ingestion (Xi) (88.3% of those that exhibit waveform X). The xylem was reached after an average of 2.2 probes, although 50% of the individuals contacted this tissue in their first probe. The mean time to contact the xylem (X) and initiate ingestion (Xi) after onset of the first probe was 27.8 and 34.2 min, respectively. However, sustained xylem ingestion (Xi > 5 min) was established only after 39.8 min, on average. This information is basic for future studies on the transmission mechanisms of *X. fastidiosa* and to establish control strategies aimed to interfere with this process.

Keywords: Cicadellinae; Sharpshooter vector; Feeding behavior; Citrus variegated chlorosis

3.1 Introdução

A Clorose Variegada dos Citros (CVC) é uma doença causada por uma bactéria gram-negativa, limitada aos vasos do xilema das plantas, denominada *Xylella fastidiosa* Wells et al. (LEE et al., 1993), transmitida por cigarrinhas da família Cicadellidae (subfamília Cicadellinae) que se alimentam nos vasos do xilema. No Estado de São Paulo principal produtor de citros do Brasil, esta doença afeta 43% das plantas de laranja doce, ocasionando perdas de produção estimadas em US\$ 100 milhões por ano (LOPES et al., 2004). Estudos de transmissão identificaram até o momento 12 espécies de cigarrinhas vetoras de *X. fastidiosa* em citros (REDAK, 2004; YAMAMOTO et al., 2007). Entre estas, *Bucephalogonia xanthophis* (Berg) é considerada vetor chave na disseminação da bactéria, destacando-se por ser frequentemente observada em pomares cítricos em formação (YAMAMOTO et al., 2001). Apesar da grande importância das cigarrinhas como vetoras, pouco se conhece sobre seu comportamento alimentar e mecanismo de transmissão de *X. fastidiosa* em citros.

Com o desenvolvimento da técnica de “Electrical Penetration Graph” (EPG) muitas questões relacionadas à alimentação de insetos fitófagos sugadores foram melhor compreendidas. Esta foi originalmente desenvolvida por McLean & Kinsey (1964), utilizando um sistema de corrente alternada (AC). Posteriormente, Tjallingii (1978) desenvolveu um sistema usando corrente direta (DC), que registra as variações geradas por componentes de resistência (R) e força eletromotriz (emf). Com a utilização ambos os sistemas de EPG, pôde-se caracterizar o comportamento alimentar de mais de 50 espécies de hemípteros (BACKUS, 1994). Sendo

utilizada para estudos de resistência de plantas à insetos sugadores (ULLMAN et al., 1988; Garzo et al., 2002; ALVAREZ et al., 2006), avaliação de plantas transgênicas (Liu et al., 2005), ação de inseticidas (NISBET et al., 1993; HARREWIJN; KAYSER, 1997) e identificação do comportamento necessário para transmissão de fitopatógenos (PRADO; TJALLINGII 1994; MARTIN et al., 1997; COLLAR; FERERES, 1998).

Em Auchenorrhyncha, a maioria dos estudos com EPG foram realizados com cigarrinhas das famílias Delphacidae e Cicadellidae (subfamílias Deltocephalinae e Typhlocybina). Nestes grupos muitas espécies já tiveram seu comportamento alimentar caracterizado e as informações obtidas utilizadas em trabalhos de resistência de plantas à insetos (RAPUSAS; HEINRICHS, 1990; KIMMIS, 1989; CALDERON; BACKUS, 1992; MESFIN et al., 1995) e transmissão de viroses (WAYADANDE; NAULT, 1993). Recentemente, os estudos de comportamento alimentar de cigarrinhas que se alimentam preferencialmente no xilema (Cicadellinae) receberam uma maior atenção. Isto se deve ao aumento da importância de doenças causadas por *X. fastidiosa* em plantas cultivadas, principalmente em videira (USA) e citros (Brasil) (HOPKINS; PURCELL, 2002). Entretanto, os estudos de EPG foram realizados apenas com duas espécies vetoras desta bactéria em videira, *Graphocephala atropunctata* (Signoret) e *Homalodisca coagulata* (Say) (ALMEIDA; BACKUS, 2004; BACKUS et al., 2005). Os padrões associados a penetração estiletar de ambas as espécies, foram caracterizados com sistema AC, e estão sendo importantes para a compreensão dos mecanismos de transmissão de *X. fastidiosa* em videira.

Apesar da grande importância da CVC, o comportamento alimentar de seus vetores e suas implicações na transmissão de *X. fastidiosa*, não foram estudados em citros. Portanto, o objetivo deste trabalho foi descrever os padrões de EPG sistema DC realizados por *B. xanthophis* em citros e investigar suas relações com as atividades estiletares e alimentação no xilema, baseando-se em correlações com estudos de excreção de “honeydew” e histologia do local de alimentação.

3.2 Desenvolvimento

3.2.1 Material e Métodos

Insetos e Plantas

Uma colônia de *B. xanthophis* foi mantida sobre plantas de *Vernonia condensata* Baker, utilizando o sistema de criação descrito por Marucci (2003), que permite a produção de insetos livres de *X. fastidiosa*. Para o estudo com EPG, ninfas de 4º e 5º instar foram retiradas da colônia de manutenção e colocadas sobre “seedlings” de laranja-doce [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck] cv. Pêra em sala climatizada (25 ± 2 °C com fotofase de 14 h) para completar o seu desenvolvimento. Apenas insetos adultos fêmeas com idade entre 5 a 8 dias após sua emergência, foram usados no estudo. As plantas teste usadas nos registros de EPG foram mudas de laranja-doce, de mesma altura (20 - 25 cm) e cultivar usada para criar os adultos. Estas foram produzidas em vasos plásticos (500 ml), contendo solo, esterco e areia (3:1:1) e mantidas em viveiros telados contra o acesso de insetos vetores.

Electrical Penetration Graph (EPG)

Os registros de EPG foram obtidos usando o sistema DC modelo GIGA-8 (Wageningen University) Tjallingii (1978; 1988), ajustados com “ganância” de 75x. O sinal analógico foi convertido a digital mediante uma placa Di-710 (Dataq[®] Instruments), acoplado a um computador Pentium4[®] para aquisição e armazenagem dos dados, por meio do programa Probe 3.0 (Laboratory of Entomology, Wageningen University).

As cigarrinhas foram anestesiadas com CO₂ durante 3 segundos e imediatamente imobilizados com auxílio de uma bomba de vácuo, semelhante a descrita por Van Helden e Tjallingii (2000), sob um microscópio estereoscópio. Um fio de ouro (Sigmund Cohn) de 37 µm de diâmetro e 3 cm de comprimento foi colocado sobre o pronoto do inseto e fixado com tintura de prata (Ted Pella Inc. no:16034 Pelco[®] Collodia Silver). Antes de ser instalado no inseto, a outra ponta do fio de ouro, foi fixada a um eletrodo de cobre 3 cm comprimento x 1 mm de diâmetro. Este eletrodo foi acoplados ao amplificador de sinais e o inseto colocado sobre a haste da planta cítrica. Outro eletrodo de cobre (10 cm de comprimento x 2 mm diâmetro) foi inserido no solo, do vaso o qual estava a planta teste. O processo de monitoramento foi realizado dentro de uma gaiola de Faraday em sala climatizada (25 ± 2 °C) com iluminação natural e artificial.

Cada cigarrinha foi monitorada por 8 horas e os dados de 20 indivíduos foram analisados com o auxílio do programa Probe 3.0. Os padrões de EPG foram descritos com base nas características da morfologia da onda, análise de espectro de amplitude (máxima e mínima), frequência (Hertz), nível de voltagem (extra ou intracelular) e origem elétrica (resistência - R ou

força eletromotriz – emf). Para esta última característica realizaram-se ajustes no nível de voltagem para positivo e negativo em diferentes períodos de cada padrão. A amplitude e frequência foram estimadas usando a média de 60 valores observados em distintos pontos para cada padrão (3 observações por inseto).

Com os padrões típicos definidos, alguns parâmetros de EPG foram calculados com a finalidade de descrever as características da penetração estiletar de *B. xanthophis* na haste de citrus durante um período de 8 h: (1) número de indivíduos que produzem um padrão específico (NPP); (2) número de vezes que um padrão foi produzido por indivíduo (NPI); (3) duração do padrão por indivíduo (DPI); (4) tempo para 1º contato com xilema, a partir da 1ª prova; (5) tempo para 1ª ingestão no xilema, a partir da 1ª prova; (6) tempo para 1ª ingestão no xilema > 5min (prova com êxito), a partir da 1ª prova; (7) tempo para 1º contato com xilema, a partir da 1ª prova com êxito; (8) tempo para 1ª ingestão no xilema, a partir da 1ª prova com êxito.

Estudou-se também a sequência típica de eventos que ocorrem durante a penetração estiletar, por meio do cálculo da probabilidade de um determinado padrão ser seguido por um outro padrão. Neste estudo foram consideradas somente as probabilidades maiores que 2% (WAYADANDE; NALT, 1996; ALMEIDA; BACKUS, 2004).

Histologia do tecido da planta

Para correlacionar os padrões de EPG com a posição dos estiletos na planta, cigarrinhas foram monitoradas sobre mudas de laranja doce e para cada padrão de interesse, a alimentação foi interrompida retirando-se o inseto da planta. Neste local o tecido da planta foi cortado e imerso em de fucsina ácida (1%) por 3 min, para facilitar a visualização da camada de saliva produzida no início da penetração estiletar. Em seguida o material vegetal foi lavado com água destilada, secado com papel-filtro, fixado em solução Karnovsky (KARNOVSKY, 1965) e desidratado à temperatura ambiente em uma série etílica crescente (10% a 100%). Para infiltração e emblocagem, se utilizou o kit Historesina (hidroxietilmetacrilato, Leica, Heidelberg). Posteriormente, realizaram-se cortes seriados transversais com espessura de 10 μ m, estes foram corados com azul de toluidina (SAKAI, 1973) e montados em resina sintética “Entellan” para realização de fotomicrografias em fotomicroscópio (Leica DM LB / DC 300 F).

Análise do “Honeydew”

Observações da excreção de “honeydew” foram realizadas simultaneamente aos registros de EPG de cigarrinhas em mudas de laranja doce, para detectar a ingestão durante um

determinado padrão. A frequência de excreção e análise química (pH ou concentração de aminoácidos) do “honeydew” durante os registros com EPG, são úteis para identificar os locais de ingestão (floema ou xilema) (WALKER, 2000).

A excreção de “honeydew” foi registrada através de um sistema de vídeo (Sony DCR-HC21) e posteriormente as imagens foram analisadas para contagem do número de gotas excretadas por minuto. O “honeydew” foi coletado através de parfilme[®] colocada abaixo do local onde o inseto estava se alimentando. Avaliou-se o pH e a presença de aminoácidos através de papel indicador de pH (Universalindikator pH, Merck) e teste de reação com niidrina (0,1%) em papel filtro. Em alguns casos os insetos excretaram diretamente sobre o papel filtro.

3.2.2 Resultados

Electrical Penetration Graphs

B. xanthophis produziu seis padrões de ondas em *C. sinensis*, sendo estes distintos dos descritos para outras espécies de cicadelídeos. Estes padrões foram nomeados com letras que representam a atividade ou local na planta onde ocorrem: S; R; X; Xi; I e W (Figura 1A–G). As principais características observadas nos padrões e suas correlações estão sumarizadas na tabela 1. Não foram observados mudanças nas características dos padrões quando o sinal foi ajustado para positivo ou negativo, mostrando que o componente principal é a força eletromotriz (emf). Durante os registros foi observado um padrão irregular semelhante a um ruído elétrico, porém com maior amplitude, que foi correlacionado através de observação visual e vídeo, com a movimentação do inseto sobre a planta. Por não representar uma atividade alimentar, este padrão não foi considerado no estudo.

Em 8 h de registro *B. xanthophis* realizou em média $5,65 \pm 0,69$ ($n = 20$) provas, com duração média de $71,39 \pm 10,29$ ($n = 113$) min/prova. O padrão S (Figura 1 B) foi sempre o primeiro a ser observado na penetração estiletar. Este padrão foi caracterizado por apresentar um traço irregular, com alta oscilação na frequência e amplitude (0,1 – 1,5 V), e um nível de voltagem intracelular (Tabela 1). Este esteve presente em todas as provas, com duração média < 2 min (Tabela 2). O padrão R (Figura 1 C) geralmente ocorreu entre dois padrões S, e apresentou um traço regular com forma plana e amplitude e frequência muito baixas. Este foi observado em 75% dos registros, com duração média > 5 min (Tabela 2).

O padrão X (Figura 1 D) comumente ocorre entre os padrões S e Xi, e foi caracterizado por um traço regular, com uma amplitude alta (0,5 – 2 V), quando comparado aos outros padrões, principalmente no início do padrão. Este padrão apresenta um nível de voltagem extracelular, e foi observado em 100% dos registros, com duração média <1 min (Tabela 2). O padrão Xi (Figura 1 E) também esteve presente em 100% dos registros, ocorrendo sempre após o padrão X, com duração média >30 min (Tabela 2). Apresenta um traço geralmente regular, porém pode variar de acordo com a flutuação da frequência que normalmente é menor no início do padrão (0,4 – 0,5 Hertz), entretanto tem uma tendência de aumentar ao longo do tempo (0,8 – 1,3 Hertz). A amplitude é a segunda maior entre os padrões descritos e o nível de voltagem indica atividade extracelular (Tabela 1).

O padrão I (Figura 1 F) representa uma queda de potencial que ocorre dentro dos padrões X e Xi, contudo com maior frequência em Xi. Este foi observado em 100% dos registros com duração média <6 s (Tabela 2). O nível de voltagem geralmente foi extracelular, entretanto em alguns casos pode ser negativo. Apresenta uma alta oscilação na frequência, a amplitude no início normalmente é baixa (0,1 – 0,4 V), porém podem ocorrer picos maiores no período final deste padrão (0,7 – 1 V).

O padrão W (Figura 1 G) esteve presente em 90% dos registros, com duração média <10 s (Tabela 2). Este foi associado com a retirada dos estiletes da planta, pois sempre foi seguido por uma não penetração (Np). Este padrão é caracterizado por um traço irregular, com alta oscilação na frequência e amplitude.

Correlações entre padrões de EPG e posição dos estiletes na planta

B. xanthophis primeiramente secreta uma pequena quantidade de saliva gelatinosa sobre a superfície da haste marcando o local da prova, posteriormente inicia a penetração estiletar através de células da epiderme (mais freqüente) ou por meio dos estômatos. Após atravessar a epiderme, os estiletes seguem intracelularmente através do parênquima (clorofiliano e cortical), floema e finalmente encontram os vasos do xilema (Figura 2A). Em algumas amostras, bainhas salivares também foram observadas, passando pelo meio das fibras pericíclicas, estruturas lignificadas que ocorrem dispersas em pequenos grupos junto ao floema. Lise celular e claramente observada durante a rota dos estiletes (Figura 2B).

Durante os registros de EPG os padrões S, R, X e Xi foram interrompidos para determinação da posição dos estiletes no tecido vegetal. As bainhas produzidas durante o padrão S (n= 4) e R

(n=3) sempre terminaram em células do parênquima (Figuras 2C e 2D, respectivamente), enquanto que bainhas produzidas durante o padrão X (n= 4) e Xi (n= 6) terminaram nos vasos do xilema secundário (Figuras 2E e 2F, respectivamente). Entre as bainha que terminam no xilema, 7 não foram ramificadas e 3 apresentaram ramificações no xilema, podendo-se observar a presença de bainha salivar dentro do vaso (Figura 2F).

Correlações entre padrões de EPG e excreção de honeydew

Entre os padrões descritos a excreção de “honeydew” foi observada somente em Xi, com frequência média de $24,54 \pm 1,26$ gotas/min (n=11). Porém, esta apenas ocorreu 3 - 5 minutos após o início deste padrão. Não existe uma correlação direta entre o número de picos realizados durante Xi com o número de gotas excretadas. Entretanto, observa-se que um aumento na frequência deste padrão, resulta em uma maior frequência de excreção. Durante este processo verificou-se uma movimentação regular dos últimos segmentos abdominais, e para cada movimento realizado observou-se a liberação de uma gota. Constatou-se que o “honeydew” excretado apresenta pH inferior a 7 (n=10) e não ocorre reação com niidrina, indicando que este apresenta uma baixa concentração ou ausência de aminoácidos.

Características e seqüência de eventos que ocorrem durante a penetração estiletar

Em 160 horas de registros, *B. xanthophis* permaneceu 15% deste tempo em não prova (Np), 7% em atividades fora do xilema (S, R, W) e 78% em atividades no xilema (X e Xi). Assim, este inseto gasta a maioria do seu tempo de prova (91,8%) no xilema, onde a principal atividade foi ingestão (Xi 97,5%). Esta cigarrinha realiza em média $2,15 \pm 0,37$ (n= 20) provas para atingir o xilema, contudo, 50% das cigarrinhas encontram este tecido logo na primeira prova. O tempo médio para o primeiro contato com o xilema (X) e início da ingestão (Xi) a partir da primeira prova foi de $27,81 \pm 6,57$ (n= 20) e $34,16 \pm 6,89$ (n=20) min, respectivamente. Entretanto, o tempo médio para ocorrência de ingestão contínua (Xi > 5 min) foi de $39,75 \pm 7,46$ min (n=20). Quando se considera somente as provas que contenham ingestão contínua, os tempos para ocorrência de X e Xi se tornam menores (Tabela 3).

Um diagrama com as seqüências de eventos que ocorrem durante uma prova de *B. xanthophis* em citros, foi estabelecido (Figura 3). O padrão I não foi representado por ocorrer dentro de X e Xi. Todos os insetos iniciam a penetração com o padrão S, destes 18% retornam a não prova (Np), 13% iniciam o padrão R e 67,6% passam para o padrão X. Já no padrão X, alguns insetos podem retornar a S, porém a maioria (88,3%) inicia Xi. Entre os indivíduos que exibem o

padrão Xi, 40,6% podem iniciar novamente X, 38,8% retornam as atividades estiletares fora do xilema (S e R) e 20,3% retiram os estiletes da planta (W). Desta forma, durante uma prova a sequência de eventos com maior probabilidade de ocorrência foi o início da penetração com o padrão S, seguido de X e então Xi, onde *B. xanthophis* permanece a maior parte do seu tempo de prova.

3.2.3 Discussão

O comportamento alimentar da cigarrinha *B. xanthophis*, um importante vetor de *X. fastidiosa*, foi estudado em plantas de citros utilizando a técnica de EPG (sistema DC), associada a estudos de histologia do local de alimentação, vídeo observações e análise do “honeydew” excretado. Este foi o primeiro trabalho de EPG-DC com cigarrinhas da subfamília Cicadellinae. Por meio de modificações anatômicas, com clipeo bem desenvolvido e com forte musculatura, este grupo de Auchenorrhyncha, se tornou especializado em se alimentar da seiva do xilema (NIELSEN, 1985). Estas adaptações provavelmente explicam a diferença dos padrões EPG-DC descritos para *B. xanthophis* em relação aos relatados para os demais grupos de Auchenorrhyncha que se alimentam preferencialmente do floema, tais como, fulgoróides (KIMMINS, 1989; BUDUCA et al., 1996) e cicadelídeos da subfamília Deltocephalinae (LETT et al., 2001).

Padrões de EPG e suas correlações

Padrão S

Este padrão representa a fase de caminamento dos estiletes, a formação da bainha salivar e a inserção dos estiletes no tecido vegetal são as principais atividades realizadas. Por meio de estudos de histológicos, observou-se que a forma de penetração estiletar é intracelular e semelhante a outras espécies de Auchenorrhyncha (CHANG, 1978; SPILLER, 1990; RAPUSAS; HEINRICHS, 1990; BUDUCA et al., 1996; BACKUS et al., 2005). Sempre que S foi interrompido as bainhas salivares terminaram no parênquima. Entretanto, este padrão também ocorre em outros tecidos, pois é observado durante toda a rota dos estiletes até o primeiro contato com o xilema.

O padrão S é caracterizado por uma queda de potencial, permanecendo em um nível de voltagem a baixo de 0 até o início do próximo padrão (R ou X). Quedas de potencial foram bem caracterizadas durante a fase de caminamento de afídeos, moscas brancas e cochonilhas

(TJALLINGII, 1978; JANSSEN et al., 1989; CALATAYUD et al., 1994) e representam a inserção dos estiletes em uma célula viva, sem danificar a integridade da membrana celular. Em fulgoróides da família Delphacidae, curtas quedas de potencial foram observadas durante a fase de caminhamento de *Nilaparvata lugens* (Stal) e no início da penetração estiletar de *Peregrinus maidis* (Ashmead) (SPILLER, 1990; BUDUCA et al., 1996). Nestes fulgoróides observouse que o potencial de membrana é destruído após a punctura. Com base nos resultados de histologia, observase que *B. xanthophis* também afeta a integridade da membrana celular durante o padrão S.

A cigarrinha *Cicadulina mbila* Naudé (Deltocephalinae) não apresentou quedas de potencial durante os padrões de caminhamento, entretanto, observou-se um padrão de ingestão ativa em tecidos não vasculares (LETT et al., 2001). Para *B. xanthophis* padrões com estas características não foram observados durante a fase de caminhamento. Segundo Backus et al (2005), diferenças entre a penetração estiletar de Cicadellinae e Deltocephalinae são esperadas, já que a maioria das cigarrinhas deste último grupo ingerem pouco do xilema e geralmente não realizam provas em tecidos mais lenhos. Em Auchenorrhyncha quimiosencilas com função de gustação são encontradas na região do precibario (BACKUS; MCLEAN, 1984). Assim, é possível que durante o padrão S ocorram tomadas de pequenas quantidades de fluidos por *B. xanthophis*, para avaliar a qualidade da planta hospedeira ou para ajudar na localização dos vasos do xilema.

Em alguns casos entre uma Np (não prova) e S observou-se um padrão positivo irregular, causado pelo contado e movimentação do inseto na planta antes da penetração estiletar. Provavelmente isto ocorre devido às características morfológicas de *B. xanthophis*, que apresenta um corpo robusto com comprimento de 5,1 mm (MARUCCI; CAVICHIOLI; ZUCCHI, 2002).

Em Cicadellinae padrões relacionados com a formação da bainha salivar e inserção dos estiletes foram caracterizados para as espécies *G. atropunctata* e *H. coagulata* em videira (ALMEIDA; BACKUS, 2004; BACKUS et al., 2005). Entretanto, por terem sido registrados usando o sistema AC, não podem ser diretamente comparados com os padrões obtidos para *B. xanthophis* neste estudo.

Padrão R

Este padrão foi associado com parênquima e apresenta uma forma plana, com duração média superior a 5 minutos, sem excreção de honeydew. Assim, R provavelmente representa uma fase de descanso com os estiletes dentro da planta. Comportamento similar a este foi observado

para a cigarrinha *Nephotettix virescens* (Distant) (Deltocephalinae) (RAPUSAS; HEINRICHS, 1990).

Padrão X

Devido a não existência de um potencial de membrana no xilema, os padrões (EPG-DC) registrados neste tecido, ocorrem em um nível extracelular (SPILLER, 1990). Para *B. xanthophis*, o padrão X sempre foi observado em nível extracelular e todas as bainhas salivares interrompidas durante este terminaram no xilema. Portanto, X representa claramente o primeiro contato dos estiletes com este tecido vascular.

Cigarrinhas que se alimentam preferencialmente no floema quando em um hospedeiro adequado, eventualmente realizam ingestão ativa no xilema. As cigarrinhas *P. maidis* e *N. lugens* (ambas Delphacidae) apresentam padrões EPG-DC no xilema, que são similares em amplitude e frequência (KIMMINS, 1989; BUDUCA et al., 1996). Contudo, o padrão X realizado por *B. xanthophis* não foi similar aos produzidos por estes delfacídeos.

Assim, é possível que X represente uma atividade em resposta a um estímulo mecânico ou químico decorrente do contato com xilema antes de iniciar a ingestão. A excreção de “honeydew” não foi observada durante este curto padrão, cuja duração foi frequentemente inferior a um minuto. Em estudos de EPG usando o sistema AC, padrões xilemáticos prévios ao padrão C (ingestão ativa) não foram observados para *G. atropunctata* e *H. coagulata* (ALMEIDA; BACKUS, 2004; BACKUS et al., 2005). Porém, o padrão B1 que representa a última etapa da fase de caminhamento em *H. coagulata*, foi algumas vezes correlacionado com contato com xilema (BACKUS et al., 2005). Dessa forma, o padrão X observado para *B. xanthophis* pode representar alguma atividade em Cicadellinae que não é detectada com sistema AC. Futuros estudos serão importantes para esclarecer as atividades biológicas que ocorrem durante este padrão.

Padrão Xi

Xi foi sempre precedido por X, permanecendo em um similar nível de voltagem. Por meio de histologia, observou-se que todas as bainhas salivares interrompidas durante este padrão terminam no xilema. Este geralmente foi observado por longos períodos de tempo e frequentemente associado à excreção de “honeydew”. Considerando que a pressão do xilema é negativa (TAIZ; ZEIGER, 2004), Xi representa ingestão ativa nos vasos do xilema, decorrente da atividade da bomba cibarial.

Semelhante ao que ocorre com X, em Xi as características de amplitude e frequência são diferentes das observadas nos padrões de ingestão ativa no xilema em Delphacidae. Para *B. xanthophis*, a gama de frequência observada em Xi, esta situada entre 0,2 – 2,5 Hz em quanto que em *P. maidis* e *N. lugens* a frequência observada durante os padrões de ingestão ativa, esta ao redor de 3-7 Hz (KIMMINS, 1989; BUDUCA et al., 1996). As diferença nos padrões EPG-DC observados durante a ingestão no xilema entre *B. xanthophis* e estes fulgoróides, possivelmente esta relacionada a uma questão filogenética, anatômica e comportamental, uma vez que Cicadellinae e Delphacidae são relatados como grupos distantes dentro de Auchenorrhyncha. Cigarrinhas de Cicadellinae geralmente são maiores e se alimentam preferencialmente no xilema, em quanto que delpacídeos preferem floema (NIELSON, 1985; SOGAWA, 1982).

Cigarrinhas que se alimentam da seiva do xilema desenvolveram adaptações que as permitiram sobreviver nesta fonte de alimento nutricionalmente pobre. Estes insetos apresentam uma alta eficiência na conversão de quase todos os componentes orgânicos (>98%) e ingerem altas quantidades de seiva (100-300 vezes o peso seco do corpo / dia) (BRODBECK et al., 1993). O “honeydew” produzido durante Xi não apresentou aminoácidos por meio do teste de niidrina e a frequência de excreção foi de ≈ 24 gotas/min. A alta taxa de excreção e a falta de níveis detectáveis de aminoácidos no “honeydew” são indicativos de ingestão no xilema, que apresentam baixas concentrações de componentes orgânicos (ANDERSEN, 1989).

Padrão I

O padrão I representa uma breve interrupção (≈ 5 s) dentro dos padrões de xilema. Este ocorreu principalmente durante o padrão Xi e eventualmente em X ou na interfase entre estes dois. Para cigarrinha *H. coagulata* usando o sistema AC, foram observados dois padrões que representam uma interrupção durante C (ingestão no xilema). “N nonpathway”, que representa provavelmente salivação aquosa no xilema e “N Pathway-like”, semelhante aos padrões de caminhamento, porém, neste caso os insetos possivelmente estão buscando um novo vaso do xilema para se alimentar (BACKUS et al., 2005).

Em *B. xanthophis* os padrões X e Xi ocasionalmente são interropindos por um curto padrão S, sendo seguido novamente de atividades no xilema. Este comportamento pode representa uma troca de vaso, o que é corroborado com a observação de bainhas com duas ramificações terminando no xilema (Figura 2F). Assim, este curto S poderia ser semelhante a “N Pathway-like” observado em *H. coagulata*, em quanto que, o padrão I similar a “N nonpathway”. Correlações

usando os dois sistemas (AC e DC) com uma mesma espécie de cigarrinha e planta hospedeira, seriam necessárias para confirmar a similaridade entre tais padrões.

Padrão W

Este curto e irregular padrão, somente foi observado quando o inseto retira os estiletes naturalmente da planta, ocorrendo o preenchimento da bainha salivar com saliva gelatinosa. Cigarrinhas quando tem sua alimentação interrompida artificialmente, retiram os estiletes sem o preenchimento da bainha salivar (Chang, 1978; Lett et al., 2001; Backus et al., 2005). Este comportamento também foi observado para *B. xanthophis* durante os estudos de correlação histológica, onde as provas interrompidas apresentaram bainhas vazias.

Características da penetração estiletar em citros

Estudos usando condicional probabilidade foram realizados com o objetivo de compreender a seqüência de eventos que ocorrem durante a penetração estiletar de hemípteros (ULLMAN; MCLEAN, 1988; WAYADANDE; NAULT, 1996; ALMEIDA; BACKUS, 2004). Em cigarrinhas da subfamília Deltocephalinae, observou-se que a seleção do tecido para alimentação não ocorre ocasionalmente, e existe um padrão de sucessivos comportamentos que levam a ingestão no floema (WAYADANDE; NAULT, 1996). Para *B. xanthophis*, também foi verificado uma seqüência de eventos com maior probabilidade de ocorrência durante uma prova, que conduz a uma ingestão de seiva no xilema. A seqüência de eventos mais provável foi: fase de caminhamento dos estiletes através de células da epiderme e parênquima (padrão S), seguido de contato (X) e ingestão (Xi) nos vasos do xilema, onde este inseto gasta a maior parte do seu tempo de prova (97,5%).

Normalmente *B. xanthophis* realiza poucas provas antes de chegar no xilema, com um tempo médio de aproximadamente 30 min para iniciar a ingestão. Contudo, quando foram consideradas somente as provas com ingestão contínua no xilema, este tempo caiu pela metade e foi inferior a 4 min para vários indivíduos. Durante algumas provas o inseto pode realizar uma pequena ingestão ($X_i < 5\text{min}$) ou somente iniciar o padrão X. Provavelmente isto ocorre, pois o vaso não apresenta uma condição satisfatória para que este permaneça se alimentado. Deste modo, a cigarrinha começa uma nova fase de caminhamento ou retira os estiletes da planta. Provas com curtos períodos de ingestão no xilema também foram observados para *G. atropunctata* e *H. coagulata* (ALMEIDA; BACKUS, 2004; BACKUS et al., 2005).

Embora cigarrinhas possam ingerir de vários tecidos de plantas, geralmente, apresentam uma preferência por um em específico (WAYADANDE; NAULT, 1996). Backus et al (2005) observou que *H. coagulata* ingere quase que exclusivamente de xilema (93%), porém, eventualmente o padrão C foi correlacionado com floema. Padrões de EPG-DC em floema são bem característicos e relativamente semelhantes em diferentes grupos de insetos sugadores. Padrões floemáticos caracterizados para cigarrinha *C. mbila*, são considerados análogos aos de afídeos (LETT et al., 2001). Durante a fase de caminamento (padrão S) os estiletes passam pelo floema antes de atingir o xilema, entretanto, atividades de ingestão neste tecido não foram observadas para *B. xanthophis* neste trabalho.

As informações obtidas sobre a penetração estiletar de *B. xanthophis* em citros, servirão de base para futuros estudos do mecanismo de transmissão de *X. fastidiosa* e desenvolvimento de táticas mais efetivas que possam interferir neste processo e reduzir a dispersão da doença em pomares cítricos. Neste trabalho, foram descritos os principais padrões relacionados com a fase de caminamento e atividades no xilema, onde supostamente ocorrem aquisição e inoculação de *X. fastidiosa*. Verificou-se que *B. xanthophis* pode encontrar o xilema e iniciar ingestão em períodos relativamente rápidos (3 a 100 min após o início da primeira prova), sugerindo que aquisição e inoculação possam ocorrer em um curto período de tempo. Futuros estudos serão realizados para determinar quais padrões de EPG estão envolvidos com aquisição e inoculação de *X. fastidiosa*, bem como o tempo limite para que estes ocorram.

Tabela 1 - Sumário das principais características e correlações dos padrões de EPG-DC descritos para *Bucephalagonia xanthophis* em *Citrus sinensis*

Padrões EPG	Características dos padrões				Correlações		
	Amplitude ¹ (%)	Frequência (Hertz)	Nível ² Voltagem	Origem do sinal elétrico	Local do estilete na planta	Excreção	Atividade
S	12.82	Mescla ³	i	emf	Todos os tecidos	Não	Secreção da bainha salivar / penetração intracelular
R	-	0.1 – 0.2	e	emf	Parênquima	Não	Não determinado
X	24.5	0.6 – 1.8	e	emf	Xilema	Não	egestão (?)
Xi	15.72	0.2 – 2.5	e	emf	Xilema	Sim	Ingestão ativa
I	7.2	Mescla	e/i	emf	Xilema (?)	Não	Não determinado
W	-	Mescla	e/i	Não determinado	Todos os tecidos	Não	Retirada dos estiletes

¹ Amplitude média; 5 V = 100% amplitude

² e: extracelular; i: intracelular

³ Alta oscilação de frequência

Tabela 2 - Parâmetros de EPG usados no estudo do comportamento alimentar de *Bucephalogonia xanthophis* sobre *Citrus sinensis* durante um período de 8 h

Waveform	NPP ^a	NPI ^b		DPI ^c	
	(n=20)	média±EP (n=20)	(min-max)	média±EP (n)	(min - max)
Np	20	6 ± 0,71	(1-13)	11,54± 1,64 (120)	(0,03 – 100,06)
S	20	11,65 ± 1,59	(2-28)	1,58± 0,2 (233)	(0,05 – 19,23)
R	15	2,3 ± 0,58	(0-9)	6,57± 0,91 (46)	(0,44 – 25,95)
X	20	12,3 ± 1,35	(3-24)	0,54± 0,04 (246)	(0,05 – 4,97)
Xi	20	10,8 ± 1,1	(3-21)	33,18 ± 2,79 (216)	(0,23 – 245,76)
Xi < 5 min	15	2,45 ± 0,56	(0-8)	2,8± 0,17 (49)	(0,23 – 4,83)
Xi > 5 min	20	8,35 ± 0,73	(3-13)	42,1± 3,31 (167)	(5,52 – 245,76)
I	20	13,15 ± 1,76	(2-29)	0,09± 0,001 (263)	(0,05 – 0,20)
W	18	2,6 ± 0,42	(0-7)	0,14± 0,01 (52)	(0,03 – 0,55)

^a Número de indivíduos que produzem um padrão específico

^b número de vezes que um padrão foi produzido por indivíduo

^c Duração do padrão por indivíduo (min)

Tabela 3 - Parâmetros sequenciais de EPG usados no estudo do comportamento alimentar de *Bucephalogonia xanthophis* sobre *Citrus sinensis* durante um período de 8 h

Parâmetros	média± EP (min) / (Min -Max) ^a
Tempo para 1 st X a partir do início da 1 st prova	27,81 ± 6,57 / (2,49 – 99,98)
Tempo para 1 st Xi a partir do início da 1 st prova	34,16 ± 6,89 / (3,49 – 101,93)
Tempo para 1 st Xi > 5min. a partir do início da 1 st prova	39,75 ± 7,46 / (3,49 – 101,93)
Tempo para 1 st X a partir do início da 1 st prova êxito ^b	8,81 ± 2,39 / (0,28 – 40,40)
Tempo para 1 st Xi a partir do início da 1 st prova êxito ^b	15,71 ± 3,21 / (3,49 – 53,48)

^aBaseado em dados de 20 indivíduos

^bProva com êxito é a que apresenta um período de ingestão no xilema > 5min

Figura 1 - Padrões de EPG produzidos por *Bucephalogonia xanthophis* sobre a haste de *Citrus sinensis*. (A)* Esquema dos principais padrões de EPG registrados, (B) padrão S, (C) padrão R, (D) padrão X, (E) padrão Xi, (F) padrão I produzido dentro de Xi e (G) padrão W. * Os padrões R e W na são mostrados no esquema geral, pois estes nem sempre são realizados

Figura 2 – Cortes transversais da haste de *Citrus sinensis* contendo bainhas salivares de *Bucephalogonia xanthophis*. (A) Bainha salivar terminando no xilema durante o padrão X (40x). (B) Detalhe da lise celular provocada pela passagem dos estiletes (100x). (C e D) Bainha salivar terminando no parênquima durante os padrões S e R, respectivamente (100x). (E) Bainha salivar terminando no xilema durante o padrão X (100x). (F) Duas ramificações da bainha salivar terminando no xilema durante o padrão Xi (100x). E: epiderme; P: parênquima; F: fibras pericíclicas; Ph: floema; X: xilema. Setas indicam o local onde as bainhas salivares terminam

Figure 3 - Sequência de eventos para *Bucephalogonia xanthophis* sobre mudas de *Citrus sinensis*. Os valores próximos da cabeça da seta correspondem a probabilidade de um determinado padrão ser seguido por um outro tipo de padrão. Probabilidades <2% não são mostradas. O padrão I não está representado no diagrama, pois ocorre dentro dos padrões X e Xi

Referências

ALMEIDA, R.P.P.; BACKUS, E.A. Stylet penetration behaviors of *Graphocephala atropunctata* (Signoret) (Hemiptera, Cicadellidae): EPG waveform characterization and quantification. **Annals of the Entomological Society of America**, College Park, v. 97, p. 838-851, 2004.

ALVAREZ, A.E.; TJALLINGII, W.F.; GARZO, E.; VLEESHOUWERS, V.; DICKE, M.; VOSMAN, B. Location of resistance factors in the leaves of potato and wild tuber-bearing *Solanum* species to the aphid *Myzus persicae*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Dordrecht, v. 121, p. 145-157. 2006.

BACKUS, E.A. History, development and applications of the electronic insect feeding monitor. In: ELLSBURY, M.M.; BACKUS, E.A.; ULMAN, D.L. (Ed.). **History, development and application of AC electronic insect feeding monitors**. Thomas Say Publications in Entomology: Proceedings. Entomological Society of America, Lanham, MD. 1994. p.1-15.

BACKUS, E.A.; MCLEAN, D.L. Behavioral evidence that the precibarial sensilla of leafhoppers are chemosensory and function in host discrimination. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Dordrecht, v. 37: 219–228, 1984.

BACKUS, E.A.; HABIBI, J.; YAN, F.; ELLERSIECK, M. Stylet penetration by adult *Homalodisca coagulata* on grape: Electrical penetration graph waveform characterization, tissue correlation, and possible implications for transmission of *Xylella fastidiosa*. **Annals of the Entomological Society of America**, College Park, v. 98, p. 787-813, 2005.

BRODBECK, B.V.; MIZELL III, R.F.; ANDERSEN, P.C. Physiological and behavioral adaptations of three species of leafhoppers in response to the dilute nutrient content of xylem fluid. **Journal of Insect Physiology**, Oxford, v.39, p. 73-81, 1993.

BUDUCA, C.; REYNAUD, B.; LAN SUN LUK, D.; MOLINARO, F. Electrical Penetration Graphs from *Peregrinus maidis* on a susceptible maize hybrid. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Dordrecht, v. 79, p. 131–139, 1996.

CHANG, V.C.S. Feeding activities of the sugarcane leafhopper: identification of electronically recorded waveforms. **Annals of the Entomological Society of América**, College Park, v. 71, p. 31-36, 1978.

COLLAR, J.L; FERERES, A. Nonpersistent virus transmission efficiency is determined by aphid probing behavior during intracellular punctures. **Environmental Entomology**, College Park, v. 27, p. 583-591, 1998.

HARREWIJN, P.; KAYSER, H. Pymetrozine, a fast-acting and selective inhibitor of aphid feeding. In-situ studies with electronic monitoring of feeding behavior. **Pesticide Science**, Oxford, v. 49, p. 130-140, 1997.

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, p. 1056-1066, 2002.

KARNOVSKY, M. J. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. **Journal of Cell Biology**, v. 27, p. 137-138, 1965.

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 the causal agent. **Summa Phytopathologica**, Jaguariuna, v.19, n. 2, p. 123-125, 1993.

LETT, J.; GRANIER, M.; GRONDIN, M.; TURPIN, P.; MOLINARO, F.; CHIROLEU, F.; PETERSCHMITT, M.; REYNAUD, B. Eletrical penetration graphs from *Cicadulina mbila* on

maize, the fine structure of its stylet pathways and consequences for virus transmission efficiency. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Dordrecht, v. 101, p.93-109, 2001.

LIU, X.D.; ZHAI, B.P.; ZHANG, X.X.; ZONG, M.J. Impact of transgenic cotton plants on a non-target pest, *Aphis gossypii* Glover. **Ecological Entomology**, London, v. 30, p. 307-315, 2005.

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

LOPES, S.A.; LARANJEIRA, F.F.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A. Clorose Variegada: perdas anuais de US\$ 100 milhões. **Visão Agrícola**, Piracicaba, v. 2, p. 20-23, 2004.

MARTIN, B.; COLLAR, J.L.; TJALLINGII, W.F.; FERERES, A. Intracellular salivation and ingestion by aphids may cause inoculation and acquisition of nonpersistently transmitted plant viruses. **Journal of General Virology**, London, v. 78, p. 2701-2705, 1997.

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

MARUCCI, R.C.; LOPES, J.R.S.; VENDRAMIM, J.D.; CORRENTE, J.E. Feeding site preference of *Dilobopterus costalimai* Young and *Oncometopia facialis* (Signoret) (Hemiptera: Cicadellidae) on citrus plants. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 33, p. 759-768, 2004.

McLEAN, D.L.; KINSEY, M.G. A technique for electronically recording aphid feeding and salivation. **Nature**, London, v. 203, p. 1358-1359, 1964.

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

MESFIN, T.; HOLLANDER, J. D.; MARKHAM, P. G. Feeding activities of *Cicadulina mbila* (Hemiptera: Cicadellidae) on host-plants. **Bulletin of Entomological Research**, Farnham Royal, v. 85, p. 387-396, 1995.

NIELSON, M.W, The Leafhoppers and Planthoppers. In: NAULT, L.R.; RODRIGUEZ, J.G.Ed). **Leafhopper Systematics**. John Wiley, 1985, p. 11-39.

NISBET, A.J.; WOODFORD, J.A.T; STRANG, R.H.C.; CONNOLLY, J.D. Systemic antifeedant effects of azadirachtin on the peach-potato aphid *Myzus persicae*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Dordrecht, v. 68, p. 87-98, 1993.

PRADO, E.; TJALLINGII, W.F. Aphid activities during sieve element punctures. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Dordrecht, v. 72, p. 157-165, 1994.

REDAK, R.A.; PURCELL, A.H.; LOPES, J.R.S.; BLUA, M.J., MIZELL, 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**, Stanford, 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.

SAKAI, W.S. Simple method for differential staining of paraffin embedded plant material using toluidine blue. **Stain Technology**, Baltimore, v. 48, p. 247-249, 1973.

SPILLER, N.J. An ultrastructural study of the stylet pathway of the brown planthopper *Nilaparvata lugens*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Dordrecht, v. 54, p. 191–193, 1990.

TAIZ L; ZEIGER E **Fisiologia vegetal**. 3rd ed Porto Alegre; Artmed, 2004. 719 p.

TJALLINGII, W.F. Electronic recording of penetration behavior by aphids. **Entomological Experimentalis et Applicata**, Dordrecht, v. 24, n. 3, p. 721-730, 1978.

TJALLINGII, W.F. Electrical recording of stylet penetration activities. In: MINKS, A.K.; HARREWIJN, P. (Ed.). **Aphids: Their biology, natural enemies and control**. Amsterdam: Elsevier, 1988. p. 95-108.

ULLMAN, D.E.; MCLEAN, D.L. The probing behavior of the summer-form pear psylla. . **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Dordrecht, v. 47, p. 115-125, 1988.

ULMAN, D.C.; QUALSET, C.O.; McLEAN, D.L. Feeding responses of *Rhopalosiphum padi* (Homoptera: Aphididae) to barley yellow dwarf virus resistant and susceptible barley varieties. **Environmental Entomology**. College Park, v. 17, p. 988-991, 1988.

WALKER, G.P. A Beginner's Guide to Electronic Monitoring of Homopteran Probing Behavior. In: WALKER GP.; BACKUS, E.A. (Ed.). **Principles and Applications of Electronic Monitoring and Other Techniques in the Study of Homopteran Feeding Behavior**. Lanham: Thomas Say Publications in Entomology; Entomological Society of America, Lanham. 2000. p. 14-40

WAYADANDE, A. C.; NAULT, L. R. Leafhopper probing behaviour associated with maize chlorotic dwarf virus transmission to maize. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 83, p. 522-526, 1993.

- WAYADANDE, A.C.; NAULT, L.R. Leafhoppers on leaves: An analysis of feeding behavior using conditional probabilities. **Journal of Insect Behavior**, New York, v. 9, p. 3-22, 1996.
- 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, p. 266, 2007.
- YAMAMOTO, P.T.; PRIA JR.; W.D.; ROBERTO, S.R.; FELIPPE, 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.
- VAN HELDEN, M.; TJALLINGII, W.F. Experimental design and analysis in EPG experiments with emphasis on plant resistance research. In: WALKER, G.P.; BACKUS, E.A. (Ed.). **Principles and applications of electronic monitoring and other techniques in the study of Homopteran Feeding behavior**. Lanham: Thomas Say Publications in Entomology, 2000. p. 144-171.

4 ASSOCIAÇÃO DE ATIVIDADES ESTILETARES DA CIGARRINHA *Bucephalogonia xanthophis* (Berg) (Hemiptera: Cicadellidae) COM A TRANSMISSÃO DE *Xylella fastidiosa* EM CITROS

Resumo

Xylella fastidiosa, agente causal da clorose variegada dos citros, é uma bactéria que coloniza os vasos do xilema de plantas, sendo transmitida por cigarrinhas (Hemiptera: Cicadellidae) especializadas em alimentação neste tecido vegetal (subfamília Cicadellinae). Esta pesquisa teve por objetivo identificar atividades estiletares da cigarrinha vetora *Bucephalogonia xanthophis* (Berg) associadas à aquisição e inoculação de *X. fastidiosa* em mudas de laranja-doce [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck], utilizando-se a técnica de “electrical penetration graph” (EPG), que permite a observação em tempo real de padrões de onda relacionados às atividades estiletares. Insetos sadios e infectivos acoplados ao sistema de EPG foram submetidos à alimentação em plantas cítricas infectadas e sadias, respectivamente, sendo interrompidos em diferentes fases da penetração estiletar. Verificou-se que a aquisição de *X. fastidiosa* em plantas infectadas ocorre somente após o início do padrão Xi (ingestão no xilema); porém, com apenas 1 h de atividades neste padrão, *B. xanthophis* subsequente transmitiu a bactéria para plantas-teste com uma eficiência de 7,7%. Em plantas sadias, a inoculação ocorreu durante os padrões S (formação da bainha salivar e caminhamento intracelular), S+X (X=primeiro contato dos estiletos com xilema) e S+X+Xi, com eficiência de 3,5; 7,1 e 7,4%, respectivamente. Embora as maiores taxas de transmissão tenham sido registradas após o contato com o xilema, é intrigante a ocorrência de inoculação de *X. fastidiosa* durante a fase pré-xilemática (padrão S), considerando-se que esta bactéria é supostamente restrita ao xilema. A capacidade de *B. xanthophis* transmitir *X. fastidiosa* em breves períodos de acesso à inoculação em plantas sadias, é discutida em termos de manejo da CVC.

Palavra-chave: Clorose Variegada dos Citros; Cigarrinhas vetoras; Comportamento alimentar; EPG

Abstract

Xylella fastidiosa, the causal agent of citrus variegated chlorosis, is a xylem-inhabiting bacterium transmitted by leafhoppers (Hemiptera: Cicadellidae) specialized on xylem feeding (subfamily Cicadellinae). The goal of this study was to identify vector stylet activities associated with acquisition and inoculation of *X. fastidiosa* in *Citrus sinensis* (L.) Osbeck, by using the electrical penetration graph (EPG) technique, which allows real time observations of waveforms related to feeding activities in the plant. Healthy and infective adults of the leafhopper vector *Bucephalogonia xanthophis* (Berg) were interrupted after different phases of stylet penetration on source and healthy (test) plants, respectively, while being monitored by EPG. Acquisition of *X. fastidiosa* from infected plants occurred only after onset of waveform Xi (xylem ingestion); but with just 1 h in Xi, *B. xanthophis* subsequently transmitted the pathogen to 7.7% of test plants. In healthy plants, inoculation took place during waveforms S (salivary sheath formation and stylet pathway), S+X (X= first xylem contact by stylets) and S+X+X1, with efficiencies of 3.5, 7.1 and 7.4%, respectively. Although higher transmission rates were recorded after the first contact with

xylem (S+X and S+X+Xi), it is intriguing the fact that inoculation of this xylem-limited bacterium also occurred before that (during S). The ability of *B. xanthophis* to transmit *X. fastidiosa* after short inoculation access periods is discussed in relation to CVC management strategies.

Keywords: Citrus variegated chlorosis; Sharpshooter vector, Feeding behavior; EPG

4.1 Introdução

A Clorose Variegada dos Citros (CVC), doença que representa atualmente um dos problemas fitossanitários de maior relevância para a citricultura brasileira é causada por uma bactéria gram-negativa, limitada aos vasos do xilema das plantas, denominada *Xylella fastidiosa* Wells et al. (LEE et al., 1993). Relatada pela primeira vez em 1987 no Estado de São Paulo (DE NEGRI, 1990), a CVC atualmente encontra-se disseminada nas principais regiões citrícolas do Brasil (TUBELIS et al., 1993; LEITE JÚNIOR et al., 1996; SANTOS FILHO et al., 1999) e América do Sul (BRLANSKY et al., 1991). A bactéria pode ser transmitida em citros por enxertia de borbulhas e raízes (MACHADO et al., 1994; HE et al., 2000); entretanto, sua disseminação natural no campo ocorre principalmente por meio de insetos vetores (LOPES, 1999).

Os insetos relatados como vetores de *X. fastidiosa* em citros são cigarrinhas pertencentes a família Cicadellidae (subfamília Cidacellinae) (REDAK et al., 2004). Antes do surgimento da CVC, estas cigarrinhas não causavam danos diretos aos pomares cítricos. Entretanto, por serem sugadores da seiva do xilema, passaram a ter uma maior importância em razão da capacidade de transmitir a bactéria (PURCELL, 1994). Entre os vetores, *Bucephalogonia xanthophis* (Berg) se destaca por se comumente encontrada em viveiros abertos e pomares cítricos em formação (ROBERTO et al., 2000; YAMAMOTO et al., 2001).

Grande parte das informações sobre as características de transmissão de *X. fastidiosa* pelos seus vetores é proveniente de estudos com as cigarrinhas *Graphocephala atropuctata* (Signoret) e *Homalodisca coagulata* (Say), associadas à doença de Pierce (“Pierce’s disease” - PD) em videiras nos Estados Unidos. Para ambas as espécies, as principais características de transmissão são semelhantes, tais como a ausência de um período latente no vetor transmissão por ninfas, porém com perda da infectividade depois da ecdise, e transmissão persistente por cigarrinhas adultas, devido à capacidade da bactéria multiplicar-se no vetor (PURCELL; FINLAY 1979; HILL; PURCELL, 1995; ALMEIDA; PURCELL 2003). Em citros, o modo de transmissão de *X. fastidiosa* provavelmente é semelhante ao observado em videira, podendo haver variações em

algumas características da transmissão, como por exemplo: tempo necessário para aquisição ou inoculação, período latente e persistência da bactéria no vetor (LOPES, 1996).

Com o advento da técnica de monitoramento eletrônico do comportamento alimentar, muitas questões relacionadas à alimentação de insetos fitófagos sugadores foram melhor compreendidas. Esta técnica foi originalmente desenvolvida por McLean e Kinsey (1964), utilizando um sistema de corrente alternada (AC). Posteriormente, Tjallingii (1978) a aperfeiçoou usando um sistema com corrente contínua (DC) e criou o termo “Electrical Penetration Graph” (EPG). Com a utilização de EPG, pôde-se caracterizar o comportamento alimentar de mais de 50 espécies de hemípteros (BACKUS, 1994), em estudos de resistência de plantas à insetos sugadores (ULLMAN et al., 1988; KIMMIS, 1989; RAPUSAS; HEINRICHS, 1990; CALDERON; BACKUS, 1992; GARZO et al., 2002; ALVAREZ et al., 2006), avaliação de plantas transgênicas (LIU et al., 2005), ação de inseticidas (NISBET et al., 1993; HARREWIJN; KAYSER, 1997) e identificação do comportamento necessário para transmissão de fitopatógenos (FERERES et al., 1993; WAYADANDE; NAULT, 1993; PRADO; TJALLINGII, 1994; MARTIN et al., 1997).

Nesta última década, os estudos de comportamento alimentar de cigarrinhas que se alimentam preferencialmente no xilema (Cicadellinae) receberam uma maior ênfase. Neste grupo de insetos, os trabalhos com EPG foram realizados com duas espécies vetoras de *X. fastidiosa* na Califórnia, *G. atropunctata* e *H. Coagulata*, utilizando-se o sistema AC (ALMEIDA; BACKUS, 2004; BACKUS et al., 2005, JOOST et al., 2006). Com sistema DC, Miranda (2008¹) descreveram seis padrões que ocorrem durante a penetração estiletar de *B. xanthophis* em citros, com destaque para: onda S, que representa a formação da bainha salivar e caminhar intracelular na epiderme e parênquima; onda X, primeiro contato dos estiletes com xilema e Xi, ingestão ativa no xilema. Entretanto, em nenhum destes estudos, a transmissão da bactéria foi avaliada.

Os trabalhos de transmissão com *X. fastidiosa* em citros, avaliaram somente a habilidade e/ou eficiência do inseto vetor em transmitir a bactéria, não sendo observada nenhuma característica deste processo (LOPES et al., 1996; ROBERTO et al., 1996; KRÜGNER et al., 2000; YAMAMOTO et al., 2002; MARUCCI, 2003). Assim, este trabalho

¹ Miranda, 2008, p. 30.

teve por objetivo determinar qual atividade estiletar de *B. xanthophis* está relacionada com o processo de aquisição e inoculação de *X. fastidiosa* em plantas de citros, de modo que tal conhecimento possa ser utilizado para o aperfeiçoamento ou desenvolvimento de táticas de controle da CVC, baseadas em interferência no processo de transmissão.

4.2 Desenvolvimento

4.2.1 Material e métodos

Insetos e plantas

Adultos de *B. xanthophis* foram obtidos utilizando o sistema de criação descrito por Marucci et al. (2003), onde os insetos são criados em plantas de *Vernonia condosata* Baker, permitindo a produção de cigarrinhas isentas de *X. fastidiosa*. Ninfas de 4º e 5º instar foram retiradas da colônia de manutenção e colocadas sobre “seedlings” de laranja-doce [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck] cv. Pêra, em sala climatizada (25 ± 2 °C, com fotofase de 14 h), para completar o seu desenvolvimento. Neste estudo foram utilizados apenas insetos adultos com idade entre 5 a 8 dias após sua emergência.

As plantas-teste usadas nos ensaios de transmissão foram “seedlings” sadios de laranja-doce cv. Pêra, com 15 cm de altura, produzidos em sacos plásticos de 500 ml contendo uma mistura de solo, esterco e areia (3:1:1). As plantas-teste foram constantemente mantidas em telados protegidos contra o acesso de insetos vetores, sendo adubadas periodicamente.

Como plantas-fonte, utilizaram-se “seedlings” de laranja-doce cv. Pêra com sintomas de CVC e população bacteriana média de $1,4 \times 10^6$ unidades formadoras de colônia (UFC). Essas plantas foram inoculadas por agulha com uma suspensão de 10^8 UFC/ml de tampão PBS (“phosphate buffer saline”) do isolado CCT 6570 de *X. fastidiosa*, 12 meses antes do teste de transmissão. A presença do patógeno nas plantas-fonte foi confirmada pelo teste de “polymerase chain reaction” (PCR) (MINSAVAGE et al., 1994), sendo que a estimativa da concentração bacteriana foi feita por isolamento primário em meio de cultura “periwinkle wilt gelrite” (PWG), conforme descrito por Almeida et al. (2001).

EPG e testes de transmissão de *X. fastidiosa*

A aquisição e a inoculação de *X. fastidiosa* por *B. xanthophis* em citros foram avaliadas durante os padrões S, X, Xi (MIRANDA, 2008¹), utilizando-se a técnica de EPG-DC. Durante a alimentação em plantas-fonte ou plantas-teste, as cigarrinhas foram acoplados a um monitor de EPG modelo GIGA-8 (Wageningen University) (TJALLINGII, 1978; 1988), ajustado para uma amplificação de 75X, sendo o sinal analógico convertido a digital mediante placa modelo Di-710 (Dataq[®] Instruments). Os registros digitalizados de EPG foram observados em tempo real por meio de um computador Pentium4[®], usando-se o programa Probe 3.0 (Laboratory of Entomology, Wageningen University).

Teste de aquisição da bactéria. Antes do monitoramento, adultos de *B. xanthophis* obtidos da criação foram confinados individualmente sobre “seedlings” sadios de *C. sinensis* por um período de 48 h, para a confirmar a ausência de *X. fastidiosa* nas cigarrinhas (pré-teste de transmissão). A seguir, esses insetos foram acoplados ao sistema de EPG utilizando a metodologia descrita por Miranda (2008¹), e posicionados sobre a haste de plantas-fonte de *X. fastidiosa* (um indivíduo por planta) para um período de acesso à aquisição (PAA) que variou de acordo com os seguintes tratamentos: S (1-2 min de caminhar dos estiletes na epiderme e parênquima), S+X (padrão S completo, seguido de 20-30 s de contato com o xilema) e S+X+Xi (S+X completos, seguidos de 1 h de ingestão nos vasos do xilema) (Figura 1). Após o PAA, a alimentação foi interrompida e os insetos retirados das plantas-fonte. Com uma tesoura cirúrgica, o fio de ouro foi cortado rente ao dorso dos insetos, sendo estes colocados individualmente sobre “seedlings” sadios de *C. sinensis* (plantas-teste) para um período de acesso à inoculação (PAI) de 96 h, para avaliar a infectividade das cigarrinhas. Durante o PAI (e também no pré-teste), os insetos foram confinados sobre a haste da brotação dos “seedlings”, por meio de gaiolas plásticas transparentes e retangulares (4 x 7 x 3 cm), contendo aberturas revestidas com tecido vaporoso (“voil”).

Teste de inoculação da bactéria. Grupos de adultos sadios de *B. xanthophis* foram confinados sobre plantas-fonte de *X. fastidiosa* para um período de acesso à aquisição (PAA) de 48 h, no interior de gaiolas retangulares (32 x 32 x 90 cm) com estrutura de alumínio e revestimento de “voil”. Em seguida, os insetos foram acoplados ao sistema de EPG e mantidos sobre plantas-teste (um indivíduo por planta) para um período de acesso à inoculação (PAI) com

¹ Miranda, 2008, p. 30.

duração variável, dependendo do tratamento, que foram os mesmos descritos para o teste de aquisição (S; S+X e S+X+Xi) (Figura 1).

Nos tratamentos S, S+X e S+X+Xi do teste de inoculação, foram avaliadas 28, 28 e 27 plantas-teste, respectivamente. No teste de aquisição, foram avaliadas 27, 28 e 26 plantas-teste nos respectivos tratamentos, além de um total de 81 plantas usadas no pré-teste. Como controle negativo para avaliação de sintomas de CVC e testes de detecção, um grupo de 10 plantas-teste não foi exposto às cigarrinhas. Como controle positivo, 10 plantas-teste foram inoculadas mecanicamente por agulha com 5 µl de uma suspensão do isolado CCT 6570 de *X. fastidiosa*, com concentração de $2,7 \times 10^8$ de UFC/ml de PBS.

Detecção de *X. fastidiosa*

As plantas-testes, pré-testes e controles foram mantidas em estufas isentas de vetores, e, após 7 e 12 meses da inoculação, realizaram-se testes de PCR para verificar a infecção das mesmas por *X. fastidiosa*. O DNA total das plantas foi extraído segundo Minsavage et al. (1994), utilizando-se o pecíolo e parte da nervura central de duas folhas por amostra, retiradas abaixo e acima do ponto de inoculação. O PCR foi realizado em termociclador PTC-100 (MJ Research, Inc., Watertown, MA 02172, EUA) com os “primers” RST31 e RST33, adicionando-se 3 µl de DNA da amostra para um volume final de reação de 25 µl. As condições de amplificação foram as mesmas descritas por Minsavage et al. (1994). Após a amplificação, 1 µl de corante (0,25% azul de bromofenol, 40% de sacarose) foi adicionado a cada amostra e os produtos da PCR foram separados por meio de eletroforese em gel de agarose (1%) em tampão TBE (89 mM Tris; 89 mM ácido bórico; 2 mM EDTA, pH 8.0) com brometo de etídio (0,5 µg/ml). Os fragmentos de DNA foram visualizados sob luz ultra violeta em equipamento de documentação de gel modelo Eagle Eye II (Stratagene, La Jolla, CA 92037, EUA).

Figura 1. Representação gráfica dos períodos de acesso à aquisição (PAA) e de acesso à inoculação (PAI) avaliados nos testes de aquisição e de inoculação de *Xylella fastidiosa* por *Bucephalogonia xanthophis* em mudas cítricas, durante registro de EPG. O quadro maior representa a seqüência típica de padrões EPG-DC que ocorrem durante uma prova (penetração). Np: não prova, estiletes fora da planta; S: secreção da bainha salivar e movimentação intracelular dos estiletes na epiderme e parênquima; X: primeiro contato dos estiletes com o xilema; e Xi: ingestão ativa de seiva do xilema

4.2.2 Resultados e Discussão

As atividades estiletares de *B. xanthophis* foram correlacionadas com os processos de aquisição e inoculação de *X. fastidiosa* em citros usando a técnica de EPG-DC. Esta técnica que já havia sido utilizada com sucesso para compreender a transmissão de vírus por afídeos e moscas-brancas (COLLAR;FERERES, 1998; JIANG et al., 2000), mostrou ser uma importante ferramenta também em estudos de transmissão de bactérias vasculares por cigarrinhas.

Teste de aquisição

A bactéria *X. fastidiosa* não foi detectada em nenhuma das plantas do pré-teste, confirmando a sanidade das cigarrinhas utilizadas neste ensaio de aquisição. Dentre os diferentes períodos de penetração estiletar do vetor avaliados em plantas-fonte da bactéria, a transmissão subsequente para plantas-teste ocorreu apenas no tratamento que incluía o padrão Xi (Tabela 1). Este resultado indica que a aquisição de *X. fastidiosa* por *B. xanthophis* ocorre somente no xilema, durante Xi. Baseando-se em estudos de histologia do local de alimentação, de frequência de excreção e de análise química do “honeydew” excretado, Xi foi descrito como ingestão ativa de seiva do xilema (MIRANDA, 2008¹). Assim, o fato de a aquisição deste patógeno, que tem seu desenvolvimento restrito aos vasos do xilema (PURCELL e HOPKINS, 1996), ocorrer durante o padrão Xi, é mais uma evidência de tal atividade biológica.

Os resultados do presente trabalho demonstram que *B. xanthophis* tem a capacidade de adquirir *X. fastidiosa* com apenas 1 h de ingestão no xilema de plantas cítricas infectadas. Em videira com PD, as cigarrinhas *G. atropunctata* e *H. coagulata* adquirem esta bactéria durante um PAA de 1 h (PURCELL; FINLAY 1979; ALMEIDA; PURCELL 2003). Entretanto, nestes estudos não se utilizou EPG, e provavelmente estes insetos gastaram parte do tempo (1 h) com não prova e caminhamento dos estiletes dentro da planta-fonte antes de iniciar a ingestão no xilema. Assim, é possível que para *B. xanthophis* a aquisição de *X. fastidiosa* em citros também possa acontecer em períodos de ingestão inferiores a 1 h; entretanto, seria necessário um estudo com PAAs mais curtos do que este, para comprovar esta hipótese.

Neste ensaio, *B. xanthophis* apresentou uma eficiência de transmissão de 7,7% após um PAA de 1 h de ingestão no xilema de plantas-fonte, seguido de um PAI de 96 h em plantas-teste. Utilizando-se PAA e PAI com durações de 48 h, Marucci et al. (2003) observou uma eficiência de transmissão por indivíduo de 5% para esta mesma espécie vetora em citros. Isto sugere que PAA mais longos que 1 h podem não resultar em aumento na eficiência de aquisição de *X. fastidiosa*, no caso deste vetor. No entanto, deve-se salientar que Marucci et al. (2003) utilizaram 3 cigarrinhas por planta-teste durante o PAI, enquanto que na presente pesquisa apenas 1 indivíduo foi usado. Hill e Purcel (1997) observaram que quando se utiliza grupo de insetos por planta-teste, a estimativa da probabilidade de um indivíduo transmitir *X. fastidiosa* se torna mais baixa.

¹ Miranda, 2008, p. 30.

Teste de inoculação

No ensaio de variação no PAI, a transmissão de *X. fastidiosa* para plantas cítricas foi observada em todos os tratamentos (Tabela 1). Um fato surpreendente foi a inoculação da bactéria durante o padrão S. Segundo Miranda (2007¹), este padrão representa a fase de caminhamento dos estiletes, e envolve a secreção da bainha salivar e inserção intracelular no tecido vegetal. Tal padrão é observado durante toda a rota dos estiletes até o início do padrão X, que representa primeiro contato com o xilema. Backus et al. (2007a; 2007b) detectaram *X. fastidiosa* na bainha salivar de *H. coagulata* produzida durante alimentação em dieta artificial, e postularam que enzimas secretadas por esta cigarrinha podem facilitar o deslocamento desta bactéria entre as células da planta. Na presente pesquisa, é possível que a interrupção durante o padrão S tenha ocorrido quando os estiletes já estavam próximos do xilema; assim, de acordo com a hipótese de Backus e colaboradores, bactérias secretadas junto com a bainha salivar teriam penetrado neste tecido com auxílio de enzimas presentes saliva.

Os tratamentos S+X e S+X+Xi resultaram em taxas semelhantes de transmissão (7,1 e 7,4%, respectivamente), e superiores ao tratamento que continha apenas S (3,5%). Embora esta diferença entre os tratamentos com ou sem etapas no xilema não seja marcante, isto sugere que maiores probabilidades de sucesso na transmissão ocorrem a partir do momento que os estiletes entram em contato com xilema.

Cigarrinhas vetoras do “maize chlorotic dwarf vírus” (MCDV), pertencentes à subfamília Deltocephalinae (Hemiptera: Cicadellidae), apresentaram um padrão característico denominado X, quando monitoradas pelo sistema AC de EPG (WAYADANDE; NAULT, 1993). Por observarem inoculação de MCDV durante X, e este vírus ser restrito ao floema de plantas de milho, estes autores postularam que tal padrão estaria associado a um comportamento de egestão de líquidos e de partículas de vírus presentes no estomodeu do vetor, durante o contato dos estiletes com os vasos do floema das plantas. Em estudos preliminares, Backus et al. (2007a) observaram a existência de um padrão X para *H. coagulata*, que possivelmente estaria relacionado com a inoculação de *X. fastidiosa* no xilema.

Uma das hipóteses sobre o mecanismo de inoculação de *X. fastidiosa*, é que a tensão negativa no xilema seria capaz de deslocar células da bactéria presentes no canal alimentar ou estomodeu do vetor em direção à planta (PURCELL, 1989). Entretanto, Almeida et al. (2005) observaram que *H. coagulata* é capaz de inocular de *X. fastidiosa* em plantas dormentes de

videira, as quais apresentam tensão positiva nos vasos do xilema. Estes autores sugeriram que tal fato representa uma evidência indireta da existência de um comportamento alimentar do vetor que promove ativamente o deslocamento da bactéria do estomodeu do inseto para planta. Portanto, é plausível que o padrão X observado em *B. xanthophis* represente tal comportamento necessário para de inoculação de *X. fastidiosa* em citros. Entretanto, o processo de inoculação também pode ser realizado por meio da bainha salivar, já que este foi observado também durante o padrão S.

Em geral, baixas eficiências de transmissão foram observadas neste trabalho, sobretudo no padrão S. Este fato também foi relatado em outros trabalhos de transmissão de *X. fastidiosa* em citros por cigarrinhas (MARUCCI, 2003; YAMAMOTO et al., 2002; DAMSTEEGT et al., 2006) e pode estar relacionado com diversos fatores, tais como: distribuição irregular de *X. fastidiosa* nas plantas hospedeiras (MIZUBUTI et al., 1994), não preferência e baixa taxa de ingestão em plantas de citros com CVC em relação a sadias (MARUCCI et al., 2005; MONTESINO et al., 2006), dificuldade de sobrevivência de infecções iniciais de *X. fastidiosa* na planta hospedeira (PURCELL, 1981) e baixa concentração da bactéria em citros (ALMEIDA et al., 2001).

Em ambos os ensaios (aquisição e inoculação) as plantas-testes que tiveram a presença de *X. fastidiosa* detectada por PCR não apresentaram sintomas. As amostras retiradas desta plantas foram folhas próximas ao ponto de inoculação (haste), mostrando que ocorreu movimentação da bactéria na planta. Nos controles negativos, em nenhuma planta se detectou *X. fastidiosa*; já nos controles positivos, que foram inoculados mecanicamente, 6 plantas tiveram a presença da bactéria confirmada e destas, 3 apresentaram sintomas.

Implicações destes resultados para manejo da CVC

Os resultados deste trabalho mostram que *B. xanthophis* pode adquirir *X. fastidiosa* com 1 h de ingestão no xilema e inocular durante um breve período de penetração estiletar, com ou sem contato com o xilema ou ingestão de seiva deste tecido.. Deve-se salientar, no entanto, que a maioria das inoculações bem sucedidas ocorreram a partir do momento que os estiletes entraram em contato com xilema. Miranda (2008¹) observou que o tempo mínimo necessário a partir da primeira prova, para *B. xanthophis* encontrar os vasos do xilema e iniciar uma ingestão contínua, foi de 2,5 e 3,5 min, respectivamente. Portanto, para que ocorra sucesso na transmissão de *X.*

¹ Miranda, 2008, p. 30.

fastidiosa por *B. xanthophis* em citros, não são necessários longos períodos de alimentação como se propôs em trabalhos prévios de transmissão por vetores (MARUCCI, 2003).

O controle químico das cigarrinhas vem sendo utilizado visando à redução da população dos vetores e com isso diminuir a disseminação da CVC em pomares cítricos (GRAVENA et al., 1997). Em citros esta tática é possível, devido principalmente à baixa eficiência de transmissão pelas cigarrinhas vetoras (LOPES, 1999). Entretanto, o fato de *B. xanthophis* apresentar a capacidade de inocular *X. fastidiosa* rapidamente, sugere que inseticidas podem não impedir a transmissão deste patógeno pelas cigarrinhas. Bethke; Blua e Redak (2001) não observaram transmissão de *X. fastidiosa* por *H. coagulata* em oleandro (*Nerium oleander* L.) após o tratamento via solo com acetamiprid, imidacloprid e thiamethoxam; porém, a pulverização de fenpropathrin e thiamethoxam não impediu que 25% das plantas testadas fossem infectadas. Já em videira, observou-se uma maior taxa de transmissão por *H. coagulata* em plantas tratadas com pimetozina via solo do que em plantas não tratadas (BEXTINE et al., 2004). Na citricultura, diversos inseticidas foram testados e apresentaram eficiência satisfatória no controle de cigarrinhas (YAMAMOTO et al., 2000; 2001; 2002).

Entretanto, mesmo com controle dos vetores, a CVC encontra-se disseminada em 43,3% dos pomares cítricos de São Paulo e Triângulo Mineiro (FUNDECITRUS, 2006). As características de transmissão observada neste trabalho poderiam explicar em parte esta alta incidência da doença em campo. É possível que alguns inseticidas usados no controle de cigarrinhas não sejam eficientes em impedir a transmissão de *X. fastidiosa*. Portanto, seriam necessários estudos para verificar a efetividade destes inseticidas na redução ou bloqueio da transmissão de *X. fastidiosa* por seus vetores em citros e selecionar os mais adequados a serem utilizados no manejo da CVC.

Tabela 1 - Detecção de *Xylella fastidiosa* em plantas de *Citrus sinensis* inoculadas por *Bucephalogonia xanthophis*, em função de diferentes períodos de acesso à aquisição (PAA) e de acesso à inoculação (PAI)

Tratamentos*	Proporção de plantas infectadas ¹		
	7 meses	12 meses	Total
PAA em plantas-fonte			
S	0/27	0/27	0/27
S + X	0/28	0/27	0/28
S + X + Xi	2/26	1/24	2/26
PAI em plantas-teste			
S	1/28	1/27	1/28
S + X	1/28	2/26	2/28
S + X + Xi	1/27	2/25	2/27
Pré-teste			
S	0/27	0/27	0/27
X	0/27	0/27	0/27
Xi	0/26	0/24	0/24
Controle positivo ²	6/10	6/10	6/10
Controle negativo ³	0/10	0/10	0/10

¹Proporção de plantas positivas para *X. fastidiosa* pelo teste de PCR sobre o total de plantas avaliadas, aos 7 e 12 meses após a inoculação.

²Plantas-teste inoculadas mecanicamente por agulha com uma suspensão de células de *X. fastidiosa*;

³Plantas-teste não inoculadas.

*S (1-2 min de caminharmento dos estiletes na epiderme e parênquima), S+X (padrão S completo, seguido de 20-30 s de contato com o xilema) e S+X+Xi (S+X completos, seguidos de 1 h de ingestão nos vasos do xilema)

Referências

ALMEIDA, R.P.P.; PURCELL, A.H. Transmission of *Xylella fastidiosa* to grapevines by *Homalodisca coagulata* (Hemiptera: Cicadellidae). **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 96, p. 264-271, 2003.

ALMEIDA, R.P.P.; BACKUS, E.A. Stylet penetration behaviors of *Graphocephala atropunctata* (Signoret) (Hemiptera, Cicadellidae): EPG waveform characterization and quantification. **Annals of the Entomological Society of America**, College Park, v. 97, p. 838-851, 2004.

ALMEIDA, R.P.P.; PEREIRA, E.F.; PURCEL, 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, p. 382-386, 2001.

ALMEIDA, R.P.P.; WISTROM, C.; HILL, B.L.; HASHIM, J.; PURCELL, A.H. Vector Transmission of *Xylella fastidiosa* to Dormant Grape. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 89, p. 419-424, 2005.

ALVAREZ, A.E.; TJALLINGII, W.F.; GARZO, E.; VLEESHOUWERS, V.; DICKE, M.; VOSMAN, B. Location of resistance factors in the leaves of potato and wild tuber-bearing *Solanum* species to the aphid *Myzus persicae*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Dordrecht, v. 121, p. 145-157. 2006.

BACKUS, E.A. History, development and applications of the electronic insect feeding monitor. In: ELLSBURY, M.M.; BACKUS, E.A.; ULMAN, D.L. (Ed.). **History, development and application of AC electronic insect feeding monitors**. Thomas Say Publications in Entomology: Proceedings. Entomological Society of America, Lanham, MD. 1994. p.1-15.

BACKUS, E.A. Feeding Behaviors of the Glassy-winged Sharpshooter That Control Inoculation of *Xylella fastidiosa*. In: PIERCE'S DISEASE RESEARCH SYMPOSIUM, 2007, San Diego. **Programme and Abstracts...** San Diego: CDFA, 2007. p. 116

BACKUS, E. A; LABAVITCH, J. M. Beta-1,4 Glucanase in Glassy-winged Sharpshooter Saliva and Its Possible Role in Infection and Movement of *Xylella fastidiosa*. In: PIERCE'S DISEASE RESEARCH SYMPOSIUM, 2007, San Diego. **Programme and Abstracts...** San Diego: CDFA, 2007. p. 120

BACKUS, E.A.; HABIBI, J.; YAN, F.; ELLERSIECK, M. Stylet penetration by adult *Homalodisca coagulata* on grape: Electrical penetration graph waveform characterization, tissue correlation, and possible implications for transmission of *Xylella fastidiosa*. **Annals of the Entomological Society of America**, College Park, v. 98, p. 787-813, 2005.

BETHKE, J.A.; BLUA, M.J.; REDAK, R.A. Effect of Selected Insecticides on *Homalodisca coagulata* (Homoptera:Cicadellidae) and Transmission of Oleander Leaf Scorch in a Greenhouse Study. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 94, p. 1031-1036, 2001.

BEXTINE, B.R.; HARSHMAN, D.; JOHNSON, MC.; MILLER, T.A. Impact of pymetrozine on glassy-winged sharpshooter feeding behavior and rate of *Xylella fastidiosa* transmission. **Journal of Insect Science**, Madison, v. 4, p. 2-6, 2004.

CALDERON, J.D.; BACKUS, E.A. Comparison of the probing behaviors of *Empoasca fabae* and *E. kraemer* (Homoptera: Cicadellidae) on resistant and susceptible cultivars of common beans. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 85, p. 88-99, 1992.

COLLAR, J.L.; FERERES, A. Nonpersistent virus transmission efficiency is determined by aphid probing behavior during intracellular punctures. **Environmental Entomology**, College Park, v. 27, p. 583-591, 1998.

DAMSTEEGT, V.D.; BRLANSKY, R.H.; PHILLIPS, P.A.; ROY, AVIJIT. Transmission of *Xylella fastidiosa*, Causal agent of citrus variegated chlorosis, by the glassy-winged sharpshooter, *Homalodisca coagulate*. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 90, p. 567-570, 2006.

DE NEGRI, J.D. **Clorose variegada dos citros**: nova anomalia afetando pomares em São Paulo e Minas Gerais. Campinas: CATI, 1990. 6 p. (CATI. Comunicado Técnico, 82).

FERERES, A.; PEREZ, P.; GAMENO, C.; PONZ, F. Transmission of Spanish pepper-PVY isolates by aphid vectors: epidemiological implications. **Environmental Entomology**, College Park, v. 22, p. 1260-1265, 1993.

FUNDECITRUS. **Estatísticas da CVC - 2005**. Disponível em:
<http://www.fundecitrus.com.br/est_cvc_br.html#inc_cvc>. Acesso em: 12 nov. 2007.

GARZO, E.; SORIA, C.; GOMEZ-GUILLAMON, M.L.; FERERES, A. Feeding behavior of *Aphis gossypii* resistant accessions of different melon genotypes (*Cucumis melo*). **Phytoparasitica**, Bet Dagan, v. 30, p. 129-140, 2002.

GRAVENA, S.; LOPES, J.R.S.; PAIVA, P.E.B.; YAMAMOTO, P.T.; ROBERTO, S.R. Os vetores da *Xylella fastidiosa*. In: DONADIO, L.C.; MOREIRA, C. S. (Ed.). **Clorose variegada dos citros**. Bebedouro: Fundecitrus, 1997. cap.3, p.37-53.

HARREWIJN, P.; KAYSER, H. Pymetrozine, a fast-acting and selective inhibitor of aphid feeding. In-situ studies with electronic monitoring of feeding behavior. **Pesticide Science**, Oxford, v. 49, p. 130-140, 1997.

HE, C.X.; LI, W.B.; AYRES, A.J.; HARTUNG, J.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, p. 622-626, 2000.

HILL, B.L.; PURCELL, A.H. Acquisition and retention of *Xylella fastidiosa* by an efficient vector, *Graphocephala atropunctata*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 85, p. 209-212, 1995.

HILL, B.L.; PURCELL, A.H. Populations of *Xylella fastidiosa* in plants required for transmission by efficient vector. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 87, p. 1197-1201, 1997.

JIANG, Y. X.; BLAS, C.; BARRIOS, L.; FERERES, A. Correlation between whitefly (Homoptera: Aleyrodidae) feeding behavior and transmission of tomato yellow leaf curl virus. **Annals of the Entomological Society of America**, College Park, v. 93, p. 573-579, 2000.

JOOST, P.H.; BACKUS, E.A.; MORGAN, D.; YAN, F. Correlation of stylet activities by the glassy-winged sharpshooter, *Homalodisca coagulata* (Say), with electrical penetration graph (EPG) waveforms. **Journal of Insect Physiology**, Oxford, v. 52, p. 327 – 337, 2006.

KIMMINS, F.M. Electrical penetration graphs from *Nilaparvata lugens* on resistant and susceptible rice varieties. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Dordrecht, v. 27, p. 77-82, 1989.

KRÜGNER, 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 new vector species. In: CONFERENCE OF INTERNATIONAL ORGANIZATION OF CITRUS VIROLOGISTS, 14., 2000, Campinas. **Proceedings...** Riverside: IOCV, 2000. p.423.

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 the causal agent. **Summa Phytopathologica**, Jaguariuna, v.19, n. 2, p. 123-125, 1993.

LIU, X.D.; ZHAI, B.P.; ZHANG, X.X.; ZONG, M.J. Impact of transgenic cotton plants on a non-target pest, *Aphis gossypii* Glover. **Ecological Entomology**, London, v. 30, p. 307-315, 2005.

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

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

LOPES, J.R.S.; BERETTA, M.J.G.; HARAKAVA, R.; ALMEIDA, R.P.P.; KRÜGNER, R.; GARCIA JR., A. Confirmação da transmissão por cigarrinhas do agente causal da clorose variegada dos citros, *Xylella fastidiosa*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 21, p. 343, 1996. Suplemento. Apresentado no CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, 29., 1996, Campo Grande.

MACHADO, M.A.; TARGON, M.L.N.; SILVÉRIO, J.L.; BAPTISTA, C.R.; CARVALHO, S.A. Transmissão da clorose variegada dos citros (III). **Laranja**, Cordeirópolis, v.15, p.97-107, 1994.

MARTIN, B.; COLLAR, J.L.; TJALLINGII, W.F.; FERERES, A. Intracellular salivation and ingestion by aphids may cause inoculation and acquisition of nonpersistently transmitted plant viruses. **Journal of General Virology**, London, v. 78, p. 2701-2705, 1997.

MARUCCI, R.C. **Eficiência de transmissão de *Xylella fastidiosa* por cigarrinhas (Hemiptera, Cicadellidae) em *Citrus sinensis* (L.) Osbeck e *Coffea arabica* L.** 2003. 139 p. Tese (Doutorado em Ciências – Área Entomologia. Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2003.

- MARUCCI, R.C.; LOPES, J.R.S.; VENDRAMIM, J.D.; CORRENTE, J.E. Influence of *Xylella fastidiosa* infection of citrus on host selection by leafhopper vectors. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Dordrecht, v. 117, p. 95-103, 2005.
- MARUCCI, R.C.; GIUSTOLIN, T.A.; MIRANDA, M.P.; MIQUELOTE, M.; 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, p. 669-675, 2003.
- McLEAN, D.L.; KINSEY, M.G. A technique for electronically recording aphid feeding and salivation. **Nature**, London, v. 203, p. 1358-1359, 1964.
- MINSAVAGE, G.V.; THOMPSON, C.M.; HOPKINS, D.L.; LEITE, R.M.V.B.C.; STALL, R.E. Development of a polymerase chain reaction protocol for detection of *Xylella fastidiosa* in plant tissue. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 84, p. 446-461, 1994.
- MIZUBUTI, E.S.G.; MATSUOKA, K.; PARIZZI, P. Associação de bactéria do tipo *Xylella* em laranjeiras com sintomas de clorose variegada na região da Zona da Mata de Minas Gerais. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.19, p.241-244, 1994.
- MONTESINO, L.H. COELHO, J.H.C.; FELIPPE, M.R.; YAMAMOTO, P.T. Ingestão de seiva do xilema de laranjeiras ‘pêra’ e ‘valência’ (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) sadias e infectadas por *Xylella fastidiosa*, pelas cigarrinhas vetoras *Oncometopia facialis* e *Dilobopterus costalimai* (Homoptera: Cicadellidae). **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 28, n. 2, p. 199-204, 2006.
- NISBET, A.J.; WOODFORD, J.A.T; STRANG, R.H.C.; CONNOLLY, J.D. Systemic antifeedant effects of azadirachtin on the peach-potato aphid *Myzus persicae*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Dordrecht, v. 68, p. 87-98, 1993.
- PRADO, E.; TJALLINGII, W.F. Aphid activities during sieve element punctures. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Dordrecht, v. 72, p. 157-165, 1994.
- PURCELL, A.H. Cigarrinhas na cultura de citros. In: SEMINÁRIO INTERNACIONAL DE CITROS, 3., Bebedouro, 1994. **Anais**. Campinas: Fundação Cargill, 1994. p.195-209.
- PURCELL, A.H. Vector preference and inoculation efficiency as components of resistance to Pierce’s disease in European grape cultivars. **Phytopathology**, Saint Paul, v.71, p.429-435, 1981.
- PURCELL, A.H. Homopteran transmission of xylem-inhabiting bacteria. In: HARRIS, K.F. (Ed.). **Advances in disease vector research**. New York: Springer-Verlag, 1989, p.243-266.

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

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

RAPUSAS, H. R.; HEINRICHS, E. A. Feeding behaviour of *Nephotettix virescens* (Homoptera: Cicadellidae) on rice varieties with different levels of resistance. **Environmental Entomology**, College Park, v. 19, p. 594-602, 1990.

REDAK, R.A.; PURCELL, A.H.; LOPES, J.R.S.; BLUA, M.J., MIZELL, 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**, Stanford, v. 49, p. 243-270, 2004.

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

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.

SANTOS FILHO, H.P.; BARBOSA, C.J.; MATRANGOLO, W.J.R.; RIBEIRO, J.S.; MEISSNER FILHO, P.E.; MIRANDA, M. P. Ocorrência da Clorose Variegada dos Citros (CVC) no Estado da Bahia. **Fitopatologia Brasileira**, v.24, p.190, 1999.

TJALLINGII, W.F. Electronic recording of penetration behavior by aphids. **Entomological Experimentalis et Applicata**, Dordrecht, v. 24, n. 3, p. 721-730, 1978.

TJALLINGII, W.F. Electrical recording of stylet penetration activities. In: MINKS, A.K.; HARREWIJN, P. (Ed.). **Aphids**: Their biology, natural enemies and control. Amsterdam: Elsevier, 1988. p. 95-108.

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, p.239-254, 1993.

ULLMAN, D.E.; QUALSET, C.O.; McLEAN, D.L. Feeding responses of *Rhopalosiphum padi* (Homoptera: Aphididae) to barley yellow dwarf virus resistant and susceptible barley varieties. **Environmental Entomology**, College Park, v. 17, p. 988-991, 1988.

WAYADANDE, A. C.; NAULT, L. R. Leafhopper probing behaviour associated with maize chlorotic dwarf virus transmission to maize. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 83, p. 522-526, 1993.

WAYADANDE, A. C.; NAULT, L. R. Leafhopper probing behaviour associated with maize chlorotic dwarf virus transmission to maize. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 83, p. 522-526, 1993.

YAMAMOTO, P.T.; GRAVENA, S. Espécies e abundância de cigarrinhas e psilídeos (Homóptera) em pomares cítricos. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Jaboticabal, v. 29, n. 1, p. 169-176, 2000.

YAMAMOTO, P.T.; PRIA JR.; W.D.; ROBERTO, S.R.; FELIPPE, 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 JR., 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**, Jaguariuna, v. 28, p. 178-181, 2002.

5 INFLUÊNCIA DE PLANTAS CÍTRICAS INFECTAS COM *Xylella fastidiosa* SOBRE A PENETRAÇÃO ESTILETAR DE *Bucephalogonia xanthophis* (BERG) (HEMIPTERA: CICADELLIDAE)

Resumo

A infecção por *Xylella fastidiosa* no xilema de plantas cítricas gera modificações fisiológicas, bioquímicas e morfológicas nas mesmas, que podem influenciar o comportamento alimentar de seus insetos vetores e, conseqüentemente, sua disseminação em campo. Utilizando-se a técnica de “electrical penetration graph” (EPG), comparou-se a penetração estiletar da cigarrinha vetora, *Bucephalogonia xanthophis* (Berg) (Hemiptera: Cicadellidae) em mudas cítricas [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck] cv. ‘Pêra, infectadas com *X. fastidiosa*, com e sem sintomas de Clorose Variegada dos Citros (CVC), em relação a plantas sadias. Por meio da análise de 26 parâmetros de EPG, verificou-se que o comportamento de alimentar desta cigarrinha foi semelhante entre plantas sadias e infectadas sem sintomas. Entretanto, em plantas sintomáticas houve redução significativa no tempo gasto por *B. xanthophis* com ingestão no xilema (padrão Xi), e as cigarrinhas permaneceram por mais tempo com os estiletes fora da planta. O tempo médio para contato com o xilema e ingestão de seiva após o início da 1ª. prova foi semelhante entre os três tratamentos avaliados. Entretanto, o tempo para ocorrência de uma ingestão contínua (> 5 min) no xilema foi maior em plantas com sintomas de CVC. Estes resultados indicam que as alterações em plantas cítricas provocadas pela infecção sintomática de *X. fastidiosa* não afetam a capacidade de *B. xanthophis* localizar os vasos do xilema, mas reduzem significativamente o tempo gasto por este inseto ingerindo seiva dos mesmos. Estas informações sobre penetração estiletar apoiam a hipótese de que a disseminação de CVC em pomares ocorre principalmente a partir de plantas-fonte assintomáticas ou com sintomas iniciais da doença.

Palavra-chave: Clorose Variegada dos Citros; Cigarrinhas vetoras; Comportamento alimentar; EPG

Abstract

The xylem colonization by *Xylella fastidiosa* promotes physiological, biochemical and morphological alterations in citrus plants that might influence the feeding behavior of vectors of this bacterial pathogen and its spread in citrus groves. By using the “electrical penetration graph” (EPG) technique, we compared the stylet penetration by the sharpshooter vector, *Bucephalogonia xanthophis* (Berg) (Hemiptera: Cicadellidae), on healthy versus infected sweet orange seedlings [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck, cv. Pêra]. Two categories of infected plants were tested: with and without symptoms of Citrus variegated chlorosis (CVC). The stylet penetration by *B. xanthophis* on healthy versus symptomless infected citrus was similar based on the analysis of 26 EPG parameters. However, this sharpshooter spent more time non-probing and less time ingesting from the xylem on symptomatic infected plants. The time period needed to contact xylem and start ingestion after the onset of the 1st probe was similar among the treatments. However, average time elapsed between onset of the 1st probe and beginning of sustained xylem ingestion (>5 min) was longer on plants with CVC symptoms. These results indicate that symptomatic infection by *X. fastidiosa* in citrus do not affect the ability of *B. xanthophis* to locate xylem vessels, but

significantly reduce time spent by this insect ingesting xylem sap. They also support the hypothesis that symptomless infected citrus trees or trees with early disease symptoms may be more important as sources for CVC spread than severely diseased ones.

Keywords: citrus variegated chlorosis; sharpshooter vector; feeding behavior; EPG

5.1 Introdução

Xylella fastidiosa se desenvolve no xilema de uma ampla gama de plantas hospedeiras (HOPKINS, 1989) e pode provocar sérios danos em diversas culturas de importância econômica (PURCELL e HOPKINS, 1996). Em citros esta bactéria é agente causal da Clorose Variegada dos Citros (CVC) (LEE et al., 1993). Plantas atacadas por esta enfermidade apresentam sintomas iniciais nas folhas, sendo observadas manchas cloróticas na face superior, correspondendo a bolhosidades cor de palha na face inferior (ROSSETTI et al., 1991). Com a evolução da doença, observa-se frutos de tamanho reduzido e endurecidos (LEE et al., 1993), podendo ocorrer desfolhamento e morte dos ramos ponteiros (ROSSETTI; DE NEGRI, 1990). Os insetos relatados como vetores de *X. fastidiosa* em citros e responsáveis pela sua disseminação natural em campo, são cigarrinhas pertencentes à família Cicadellidae, subfamília Cicadellinae (LOPES, 1999; REDAK et al., 2004).

Estudar o comportamento alimentar de insetos sugadores, sempre foi complexo, devido as atividades alimentares ocorrerem dentro do tecido vegetal. Entretanto, a partir de 1964, com a introdução da técnica de monitoramento eletrônico do comportamento alimentar (MCLEAN; KINSEY, 1964), muitas questões relacionadas à alimentação de insetos fitófagos sugadores foram melhor compreendidas. O sistema original desenvolvido por McLean e Kinsey utilizava corrente alternada (AC). Tjallingii (1978) desenvolveu um sistema usando corrente direta (DC) e criou o termo “Electrical Penetration Graph” (EPG). Com a utilização destas técnicas, pôde-se caracterizar o comportamento alimentar de mais de 50 espécies de hemípteros (BACKUS, 1994). Estas também foram utilizadas com sucesso para estudar alterações no comportamento alimentar de afídeos em plantas infectadas por vírus (FERERES et al., 1990; ALVAREZ et al., 2007).

Nos últimos anos, estudos de comportamento alimentar com cigarrinhas vetoras de *X. fastidiosa* receberam uma maior ênfase. Isto se deve ao aumento da importância de doenças causadas por esta bactéria em plantas cultivadas (HOPKINS; PURCELL, 2002). Os trabalhos de EPG com Cicadellinae foram mais concentrados com as espécies *Graphocephala atropuctata*

(Signoret) e *Homalodisca coagulata* (Say) utilizando o sistema AC (ALMEIDA; BACKUS, 2004; BACKUS et al., 2005; JOOST et al., 2006). Recentemente, Miranda (2007¹), usando o sistema DC, descreveu seis padrões que ocorrem durante a penetração estiletar de *Bucephalogonia xanthophis* (Berg) em citros.

Interações envolvendo planta hospedeira, patógeno e inseto vetor geralmente são complexas. A presença do patógeno gera modificações fisiológicas, bioquímicas e morfológicas nestas plantas, que podem ser vantajosas ou não para o inseto vetor. BLUA et al., (1994) observaram que *Aphis gossypii* Glover quando se desenvolve em abóbora infectada com “zucchini yellow mosaic vírus” (ZYMV) apresenta maior longevidade e capacidade reprodutiva. Plantas de batata infectadas com potato leafroll virus (PLRV) emitem voláteis que as tornam mais atrativas a *Myzus persicae* (Sulzer), quando comparadas a sadias (EIGENBRODE et al., 2002). Entretanto, a presença de “barley yellow dwarf vírus” (BYDV) em trigo, reduz a concentração de aminoácidos totais no floema, o que leva a uma menor eficiência de assimilação e quantidade de honeydew excretado por *Sitobion avenae* (F.) (FIEBIG et al., 2004).

O mecanismo de patogenicidade de doenças causadas por *X. fastidiosa*, todavia não foi totalmente compreendido. Segundo Hopkins (1989) este poderia ser causado por um desbalanço de reguladores de crescimento, produção de fitotoxinas e disfunção do sistema de condução de água. Entretanto, tem-se sugerido que esta ultima hipótese seja o principal mecanismo de patogênese, ocasionado pela obstrução dos vasos do xilema por agregados de células bacterianas, deposição de gomas, pectina e formação de tiloses pelo hospedeiro (FRY; MILHOLLAND, 1990; MOLLENHAUER; HOPKINS, 1976; QUEIZOZ-VOLTAN; PARADELLA FILHO, 1999). Em plantas com CVC foram observadas diversas disfunções fisiológicas, tais como: diminuição no fluxo de seiva, na assimilação de CO₂, fotossíntese e transpiração (MACHADO et al., 1994; HABERMANN et al., 2003). Plantas afetadas por esta doença também podem apresentar alterações anatômicas e bioquímicas como resposta de defesa à presença deste patógeno (MARTINS et al., 1999; QUEIZOZ-VOLTAN; PARADELLA FILHO, 1999).

Mizell e French (1987) observaram que a ocorrência e sobrevivência da cigarrinha *Homalodisca coagulata* (Say) em pêsego infectado com *X. fastidiosa* e com sintomas da doença Redução do Porte do Pessegueiro, é menor que, quando comparado com plantas sadias. Em testes de livre escolha as cigarrinhas *Dilobopterus costalimai* Young e *Oncometopia facialis* (Signoret), preferem plantas cítricas sadias, em relação à com sintomas de CVC (MARUCCI et al., 2005).

Estas cigarrinhas também apresentaram uma menor taxa de excreção quando confinadas em plantas com sintomas desta doença (MONTESINO et al., 2006). Deste modo, modificações provocadas por *X. fastidiosa* em seu hospedeiro, podem influenciar no comportamento alimentar de seus insetos vetores. Entretanto, nenhum estudo aprofundado foi realizado para identificar, quais atividades alimentares dentro da planta são afetadas pela presença deste patógeno. Assim, esse trabalho tem por objetivo, avaliar o comportamento alimentar de *B. xanthophis* em plantas cítricas infectadas com *X. fastidiosa*, com e sem sintomas de CVC, em relação a plantas saudáveis, utilizando a técnica de EPG.

5.2 Desenvolvimento

5.2.1 Material e métodos

Insetos

Adultos de *B. xanthophis* foram criados em plantas de *Vernonia condosata* Baker, utilizando o sistema de criação descrito por Marucci et al. (2003), que permite a obtenção de cigarrinhas saudáveis e com idade padronizada. Fêmeas adultas com 2 a 3 dias após a emergência, foram retiradas da colônia de manutenção e colocadas sobre “seedlings” de laranja-doce [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck] cv. Pêra, em sala climatizada (25 ± 2 °C com fotofase de 14 h) para um período de aclimação de 48 h e posteriormente utilizadas no ensaio de comportamento alimentar.

Plantas

As plantas teste usadas neste ensaio foram “seedlings” de laranja-doce cv. ‘Pêras com 30 - 40 cm de altura, em vasos plásticos de 4 L contendo solo, esterco e areia (3:1:1). Estas foram distribuídas em três tratamentos: 1) plantas saudáveis; 2 e 3) plantas infectadas com *X. fastidiosa*, inoculadas mecanicamente a 6 e 12 meses, sem e com sintomas de CVC, respectivamente. Em todos os tratamentos retiraram-se amostras foliares próxima ao local onde os insetos foram colocados para alimentação, e realizaram-se os testes diagnósticos de “polymerase chain reaction” (PCR) (MINSAVAGE et al., 1994), sendo que a estimativa da concentração bacteriana foi feita por isolamento primário em meio de cultura “periwinkle wilt gelrite” (PWG), conforme descrito por Almeida et al. (2001). Com estes resultados, quatro plantas por tratamento foram

selecionadas, para serem utilizadas no ensaio com EPG. No tratamento 1, nenhuma planta selecionada estava infectada com *X. fastidiosa* e nos tratamentos 2 e 3 as plantas apresentavam uma população bacteriana média de $2,5 \times 10^5$ e $1,4 \times 10^6$ unidades formadoras de colônia (UFC) do isolado CCT 6570/ g de tecido de folha, respectivamente.

Electrical Penetration Graph (EPG)

O monitoramento do comportamento alimentar foi realizado por meio da técnica de EPG-DC modelo GIGA-8 (Wageningen University) cuja descrição detalhada foi realizada por Tjallingii (1978; 1988). Os registros foram realizados com “ganância” de 75x e o sinal analógico convertido a digital mediante uma placa Di-710 (Dataq® Instruments). Um computador Pentium4® foi acoplado a este sistema para aquisição e armazenagem dos dados utilizando o programa Probe 3.0 (Laboratory of Entomology, Wageningen University). O processo de monitoramento foi realizado em sala climatizada (25 ± 2 °C) com iluminação natural e artificial, dentro de uma gaiola de Faraday, onde duas plantas teste de cada tratamento foram distribuídas ao acaso. A cada novo registro estas plantas eram substituídas e uma nova ordem de arrumação era realizada. Os insetos foram acoplados ao sistema de EPG utilizando a metodologia descrita por Miranda (2008¹) e colocados individualmente sobre a haste das plantas testes, tomando-se o cuidado de padronizar o estagio vegetativo da haste usada nos distintos tratamentos. Os registros de EPG foram de 4 horas de duração para cada um dos indivíduos avaliados, sendo realizados ao todo, 20, 20 e 17 registros para os tratamentos 1, 2 e 3, respectivamente.

Posteriormente realizou-se a marcação dos registros com o auxílio do programa Probe 3.0, com base nos padrões descritos por Miranda (2008¹), definidos como: (S) formação da bainha salivar e caminhamento intracelular; (R) estiletes inseridos na planta, porém aparentemente sem atividades; (X) primeiro contato dos estiletes com xilema; (Xi) ingestão ativa no xilema; (I) breve interrupção que ocorre durante X e Xi e (W) retirada dos estiletes da planta. Com estes dados, calcularam-se parâmetros de EPG (VAN HELDEN; TJALLINGII, 2000), com a intenção de observar, as diferenças existentes no processo de penetração estiletar de *B. xanthophis*, em plantas cítricas dos diferentes tratamentos. Estes foram divididos em, não sequenciais: número de vezes que um determinado padrão ocorre por registro e duração total do padrão por registro; e sequenciais, tempo necessário para que ocorra: 1ª prova a partir do início do registro, 1º X a partir do início do registro, 1º X a partir da 1ª prova, 1º Xi a partir do início do registro, 1º Xi a partir da

¹ Miranda, 2008, p. 30.

1ª prova, $1^{\circ} X_i > 5 \text{ min}$ a partir do início do registro, $1^{\circ} X_i > 5 \text{ min}$ a partir da 1ª prova. Os dados foram transformados ($\sqrt{x+1}$), submetidos a uma análise de variância (ANOVA) e posteriormente ao teste de comparação de médias de Fisher LSD.

5.2.2 Resultados

Em todos os parâmetros analisados, plantas sadias não diferiram estatisticamente de plantas infectadas sem sintomas, entretanto, quando estes tratamentos foram comparados a plantas com sintomas, observaram-se diferenças significativas em alguns parâmetros (Tabela 1).

Os parâmetros não sequenciais, relativos ao número de vezes que o inseto realiza um padrão durante um registro, mostraram que em plantas com sintomas, *B. xanthophis* realiza uma maior quantidade de Np (não provas) e dos padrões S, e W, indicando que estas cigarrinhas realizam um maior número de provas netas plantas, em relação a sadias e assintomáticas. Entretanto, o número de provas que ocorrem antes do primeiro contato com xilema, foi baixo em ambos os tratamentos e não se diferencia entre si ($P = 0,702$). Diferenças estatísticas, também não foram observadas nos demais parâmetros relacionados com xilema. Em todos os tratamentos 100% das cigarrinhas conseguiram realizar ingestão contínua ($>5\text{min}$) em vasos do xilema. Com relação ao número de vezes que ocorre o padrão R, em plantas sadias e assintomáticas, as cigarrinhas se comportaram de modo semelhante, contudo, diferiram das plantas com sintomas ($P = 0,003$).

Nos parâmetros não sequenciais de duração total, observou-se que em plantas sintomáticas *B. xanthophis* permanece um maior tempo em Np, em relação a assintomáticas e sadias ($P < 0,01$). Este fato fica bem evidenciado quando se observa a proporção de insetos que realizam um determinado padrão em diferentes intervalos de tempo ao longo dos registros (Figura 1). O tempo de permanência durante o padrão S, foi semelhante entre os três tratamentos avaliados ($P = 0,126$), durante uma prova este padrão representa a maioria das atividades estiletares que ocorrem fora do xilema. No padrão R, em plantas sadias as cigarrinhas se comportaram de modo semelhante em relação as infectadas pela bactéria, entretanto, estas últimas diferiram entre si ($P = 0,008$). Em plantas infectadas, sem e com sintomas de CVC, o tempo gasto no padrão X, não foi alterado em relação a sadias ($P = 0,345$). Contudo, o período de ingestão no xilema foi bem inferior em plantas com sintomas, em relação aos demais tratamentos ($P < 0,01$), sendo esta

diferença também significativa, mesmo quando se soma ambas as atividades no xilema ($X + X_i$) ($P < 0,01$). A duração total dos padrões I e W não diferiram entre os tratamentos analisados ($P = 0,631$; $P = 0,5$, respectivamente).

Por meio de parâmetros não sequenciais, observou-se que o tempo necessário para que *B. xanthophis* realize a primeira prova e inicie ingestão no xilema, não diferiu entre as plantas saudas e infectadas com *X. fastidiosa*. Contudo o tempo para ocorrência de uma ingestão contínua (> 5 min), foi significante maior em plantas com sintomas de CVC, em relação a saudas ou assintomáticas (Tabela 1). Os menores tempos observados para que este tipo de ingestão ocorresse, a partir do início do registro foram: 4,26; 11,36 e 10,94 min em plantas saudas, assintomáticas e sintomáticas, respectivamente.

5.2.3 Discussão

Neste estudo, parâmetros de EPG foram usados para verificar o efeito de plantas cítricas infectadas com *X. fastidiosa* sobre a penetração estiletar de *B. xanthophis*. Plantas sem sintomas de CVC não interferem no comportamento alimentar deste inseto, quando comparadas a saudas, entretanto, plantas com sintomas influenciaram negativamente, principalmente nos parâmetros relacionados com ingestão contínua no xilema (> 5 min). Alvarez et al. (2007), também observaram que o comportamento alimentar de *M. persicae* em plantas infectadas com “potato leafroll vírus” (PLRV) somente é modificado a partir do momento que as plantas mostram sintomas visuais. Neste caso, a infecção por este vírus facilita a penetração estiletar, observando-se um reduzido número de prova e curto período de tempo para o primeiro contato com floema. Entretanto, nestas plantas o padrão E1 (salivação no floema) ocorre com uma maior frequência, em relação a plantas saudas, e E2 (salivação + ingestão) não aumenta significativamente.

O fato do tempo necessário para que *B. xanthophis* realize a primeira prova, encontre os vasos do xilema e inicie ingestão, não diferir entre os três tratamentos avaliados, e também, o número de provas que ocorrem antes do primeiro contato com xilema serem reduzidos e semelhantes para todos os tratamentos, mostra que ao menos na haste, a presença de *X. fastidiosa*, independente do grau de infecção, não interfere na penetração estiletar em tecidos não vasculares. Segundo Queiroz-Voltan e Paradela Filho, (1999), na haste de ramos com sintomas de CVC, não são observadas divisões celulares anormais na epiderme e parênquima, como acontece em folhas

com sintoma da doença. Auquenorriscos em geral apresentam sensilas quimio-receptoras no ápice do rostro, estas estruturas quando postas em contato com a superfície da planta, permitem a estes insetos obter informações sobre o hospedeiro selecionado (BACKUS, 1985). Entretanto, estes resultados indicam que este comportamento utilizado para seleção hospedeira por auquenorriscos, não permite *B. xanthophis* distinguir plantas sadias de infectadas por *X. fastidiosa* através da superfície da haste, sendo necessário a realização de provas para que isso ocorra.

Diversos trabalhos relatam os efeitos da oclusão de vasos do xilema, causados pela presença de *X. fastidiosa*, sobre a fisiologia de plantas cítricas (MACHADO et al., 1994; HABERMANN et al., 2003; RIBEIRO; MACHADO; OLIVEIRA, 2004). Machado et al. (2006) verificaram que o fluxo de seiva no xilema é 1,9 superior em plantas sadias em relação a doentes, estas também apresentam o potencial da água (Ψ) da folha significativamente menor que o observado em plantas sadias. Assim, plantas infectadas por esta bactéria apresentam a pressão dos vasos do xilema mais negativa, de que plantas sadias, e conseqüentemente cigarrinhas que se alimentam neste tecido vascular necessitam de um esforço maior para sucção da seiva.

Em plantas com sintomas, o tempo gasto por *B. xanthophis* com ingestão no xilema foi significativamente reduzido em relação a sadias e assintomáticas. Montesino et al. (2006), observou que as cigarrinhas *O. facialis* e *D. costalimai* excretam reduzidas quantidade de “honeydew” quando são confinadas em plantas com sintomas severos de CVC em comparação a sadias. Alves (2003) observou que em plantas cítricas com sintomas foliares leves e intensos de CVC, a proporção de vasos colonizados por *X. fastidiosa* no pecíolo foi de 8 e 11,8%, respectivamente. Entretanto, este autor explana que esta proporção pode ser maior já que os vasos colonizados não são os mesmos ao logo do pecíolo. Este também observou que durante o processo de colonização dos vasos do xilema, varias etapas são observadas, desde o momento do estabelecimento inicial da bactéria com poucas células, até a completa oclusão do lume, com produção de material fibrilar e goma. Assim, possivelmente em plantas assintomáticas o nível de comprometimento dos vasos ainda é pequeno, o que explicaria pelo menos em parte, o semelhante desempenho do comportamento alimentar de *B. xanthophis* nestas plantas, quando comparado a sadias.

Em plantas com sintomas de CVC, *B. xanthophis* permanece mais tempo em Np, do que com ingestão no xilema e também realiza um maior número vezes o padrão S e Np. Isso provavelmente aconteceu, uma vez que estes insetos após algumas tentativas sem sucesso de

manter ingestão contínua em vasos do xilema que estavam obstruídos, iniciam a busca de um outro vaso ou acabam retirando os estiletes da planta. Sendo que estas cigarrinhas posteriormente iniciam uma nova prova, ou permanecem em Np até o final do registro. O fato de *B. xanthophis* não diferir na duração total do padrão R em relação a plantas sintomáticas, aparentemente não tem explicação. Este padrão foi descrito como uma provável fase de descanso, onde os estiletes permanecem dentro da planta, aparentemente sem atividades (Miranda, 2007¹). Em um estudo com *Nephotettix virescens* (Distant) (Deltocephalinae) usando o sistema AC, um similar comportamento foi observado, entretanto neste caso, com uma maior duração em plantas de arroz resistentes a esta cigarrinha, em relação a suscetíveis (RAPUSAS; HEINRICHS, 1990).

Em ensaios de livre escolha realizados em laboratório, Marucci et al. (2005) observaram que mudas cítricas com sintomas de CVC se tornam menos atrativas para as cigarrinhas *D. costalimai* e *O. facialis* em relação a sadias. Sendo que para a primeira espécie, com apenas 1 h após a liberação, um elevado número de insetos já haviam selecionado as plantas sadias, em relação a sintomáticas. Contudo, para *O. facialis* um período mais longo é necessário para que ocorra a discriminação entre estas plantas. Entretanto, esta cigarrinha não diferencia plantas sadias de assintomáticas. Assim, estes autores acreditam que plantas sem sintomas de CVC possam ser fontes de inoculo de *X. fastidiosa* mais importantes, que as sintomáticas.

No presente estudo, por meio da técnica de EPG, observou-se que *B. xanthophis* também não distingui plantas sadias de assintomáticas, contudo, apresenta uma nítida discriminação quando se compara estas plantas, com sintomáticas. Além disso, os resultados deste trabalho indicam que, a distinção de plantas sintomáticas das demais, ocorre somente a partir do momento que esta cigarrinha, não conseguem manter uma ingestão contínua no xilema (>5min). O tempo mínimo necessário a partir do início do registro, para que este tipo ingestão ocorra, foi inferior a 12 min, tanto em plantas assintomáticas como sintomáticas. Assim, possivelmente as espécies observadas no trabalho de Murucci et al. (2005) também tenham realizado provas e utilizado estas para discriminar plantas sadias e assintomáticas de sintomáticas. Seria interessante verificar se nestas provas discriminatórias as cigarrinhas apresentam a capacidade de adquirir *X. fastidiosa* e posteriormente inocular em plantas sadias. Miranda (2008¹) observou que *B. xanthophis* tem a habilidade de transmitir esta bactéria, com um período de aquisição prévio, de 1 h de ingestão no xilema de plantas fontes.

¹ Miranda, 2008, p. 54.

Com os resultados deste trabalho, pôde-se compreender o que acontece durante a penetração estiletar de *B. xanthophis* em plantas cítricas infectadas com a bactéria *X. fastidiosa*. Estes corroboram as observações feitas por Marucci et al. (2005), de que plantas assintomáticas provavelmente sejam fontes de inoculo mais importantes que plantas com sintomas de CVC. Além disso, a constatação que provas são realizadas para diferenciar plantas sintomáticas, de sadias e assintomáticas, reforça a importância da disseminação secundária entre plantas nos pomares cítricos (LARANJEIRA et al., 1998). Os parâmetros de EPG aqui analisados, geralmente são usados em trabalhos de resistência de plantas a insetos sugadores, entretanto neste estudo, mostraram-se bastante úteis para apontar as modificações provocadas no comportamento alimentar de *B. xanthophis*, quando colocada em plantas infectadas com *X. fastidiosa*, podendo ser usados também em futuros trabalhos de preferência de planta hospedeira, efeito de inseticidas e/ou outros tratamentos, sobre a alimentação deste grupo de insetos vetores.

Tabela1 - Parâmetros de EPG (média $\pm$ erro padrão) usados no estudo do comportamento alimentar de *Bucephalogonia xanthophis* sobre mudas de *Citrus sinensis* sadias e infectadas com *Xylella fastidiosa*, sem sintomas e com sintomas de CVC, durante o período de 4 h

Parâmetros EPG	Sadias (n=20)	Sem sintomas (n=20)	Com sintomas (n=17)	F	P
Número de vezes que ocorre					
Np (não prova)	2,15 $\pm$ 0,28 a ¹	2,70 $\pm$ 0,32 a	5,18 $\pm$ 0,53 b	17,79	0,00
Provas antes de X	1,15 $\pm$ 0,22 a	0,95 $\pm$ 0,24 a	0,94 $\pm$ 0,027 a	0,35	0,702
S	5,20 $\pm$ 0,68 a	5,60 $\pm$ 0,63 a	12,12 $\pm$ 1,63 b	12,47	0,00
R	1,00 $\pm$ 0,34 a	0,65 $\pm$ 0,33 a	2,29 $\pm$ 0,68 b	3,55	0,036
X	5,60 $\pm$ 0,56 a	7,20 $\pm$ 0,80 a	8,12 $\pm$ 1,38 a	1,45	0,242
X não seguido de Xi	0,70 $\pm$ 0,16 a	1,15 $\pm$ 0,39 a	1,88 $\pm$ 0,52 a	2,38	0,101
Xi	4,95 $\pm$ 0,47 a	6,05 $\pm$ 0,68 a	6,29 $\pm$ 1,07 a	0,65	0,526
Xi > 5 minutos	4,00 $\pm$ 0,42 a	4,30 $\pm$ 0,57 a	2,88 $\pm$ 0,64 a	2,53	0,089
I	0,85 $\pm$ 0,20 a	0,90 $\pm$ 0,25 a	1,24 $\pm$ 0,34 a	0,47	0,627
W	0,55 $\pm$ 0,18 a	0,90 $\pm$ 0,25 a	1,76 $\pm$ 0,34 b	6,45	0,003
Duração total ²					
Np	46,50 $\pm$ 9,99 a	63,03 $\pm$ 13,76 a	129,92 $\pm$ 14,25 b	11,17	0,00
S	159,13 $\pm$ 32,13 a	201,73 $\pm$ 48,49 a	89,21 $\pm$ 17,61 a	2,15	0,126
R	7,84 $\pm$ 2,45 ab	3,40 $\pm$ 1,77 a	22,11 $\pm$ 7,01 b	5,26	0,008
X	4,26 $\pm$ 0,63 a	5,14 $\pm$ 1,26 a	6,29 $\pm$ 1,13 a	1,08	0,345
X não seguido de Xi	0,63 $\pm$ 0,25 a	0,95 $\pm$ 0,43 a	2,14 $\pm$ 0,87 a	2,91	0,063
Xi	164,62 $\pm$ 11,91 a	149,22 $\pm$ 12,61 a	46,59 $\pm$ 11,61 b	30,57	0,00
X + Xi	168,25 $\pm$ 12,06 a	153,41 $\pm$ 12,71 a	50,74 $\pm$ 11,77 b	29,20	0,00
I	13,91 $\pm$ 5,47 a	6,14 $\pm$ 2,62 a	6,33 $\pm$ 3,08 a	0,46	0,631
W	0,85 $\pm$ 0,79 a	0,14 $\pm$ 0,06 a	0,32 $\pm$ 0,07 a	0,70	0,500
Tempo até ²					
1ª prova a partir do início do registro	12,50 $\pm$ 5,00 a	23,53 $\pm$ 6,07 a	21,66 $\pm$ 5,20 a	1,55	0,221
1º X a partir do início do registro	39,60 $\pm$ 9,08 a	48,47 $\pm$ 8,07 a	50,26 $\pm$ 7,73 a	1,03	0,364
1º X a partir do início 1ª prova	27,10 $\pm$ 7,80 a	24,93 $\pm$ 5,78 a	28,61 $\pm$ 6,33 a	0,15	0,859
1º Xi a partir do início do registro	41,61 $\pm$ 9,10 a	51,32 $\pm$ 8,09 a	55,98 $\pm$ 7,76 a	1,36	0,265
1º Xi a partir do início 1ª prova	29,11 $\pm$ 7,81 a	27,79 $\pm$ 5,81 a	34,32 $\pm$ 6,28 a	0,46	0,628
1º Xi > 5 min a partir do início do registro	46,16 $\pm$ 9,65 a	57,15 $\pm$ 8,25 a	100,35 $\pm$ 18,08 b	5,34	0,00
1º Xi > 5 min a partir do início 1ª prova	33,66 $\pm$ 8,71 a	33,62 $\pm$ 6,28 a	81,51 $\pm$ 19,47 b	5,04	0,01

¹Medias seguidas da mesma letra, na mesma linha, não diferem significativamente ($P < 0,05$) usando o teste de Fisher LSD com valores transformados $x = (\sqrt{x + 1})$.

² Valores em minutos.

Figura 1 - Porcentagem de indivíduos de *Bucephalogonia xanthophis* em diferentes padrões (EPG), em intervalos de 30 minutos, em mudas de *Citrus sinensis* sadias, infectadas com *Xylella fastidiosa*, sem e com sintomas de CVC

Referências

- ALMEIDA, R.P.P.; BACKUS, E.A. Stylet penetration behaviors of *Graphocephala atropunctata* (Signoret) (Hemiptera, Cicadellidae): EPG waveform characterization and quantification. **Annals of the Entomological Society of America**, College Park, v. 97, p. 838-851, 2004.
- ALVAREZ, A.E.; TJALLINGII, W.F.; GARZO, E.; VLEESHOUWERS, V.; DICKE, M.; VOSMAN, B. Location of resistance factors in the leaves of potato and wild tuber-bearing *Solanum* species to the aphid *Myzus persicae*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Dordrecht, v. 121, p. 145-157. 2006.
- ALVES, E. *Xylella fastidiosa* – adesão e colonização em vasos do xilema de laranja doce, cafeeiro, ameixeira, fumo e espécies de cigarrinhas vetoras e formação de biofilme sobre película de poliestireno. 2003. 122 p. Tese (Doutorado em Agronomia – Área Fitopatologia). Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2003.
- BACKUS, E.A. Anatomical and sensory mechanisms of leafhopper and planthopper feeding behavior. In: NAULT, L.R.; RODRIGUEZ, J.G. (Ed.). **The leafhoppers and planthoppers**. New York: John Wiley, 1985. p.163-195.
- BACKUS, E.A. History, development and applications of the electronic insect feeding monitor. In: ELLSBURY, M.M.; BACKUS, E.A.; ULMAN, D.L. (Ed.). **History, development and application of AC electronic insect feeding monitors**. Thomas Say Publications in Entomology: **Proceedings...** Entomological Society of America, Lanham, MD. 1994. p.1-15.
- BACKUS, E.A.; HABIBI, J.; YAN, F.; ELLERSIECK, M. Stylet penetration by adult *Homalodisca coagulata* on grape: Electrical penetration graph waveform characterization, tissue correlation, and possible implications for transmission of *Xylella fastidiosa*. **Annals of the Entomological Society of America**, College Park, v. 98, p. 787-813, 2005.
- EIGENBRODE, S.D.; DING, H.; SHIEL, P. BERGER, P.H. Volatiles from potato plants infected with potato leafroll virus attract and arrest the virus vector, *Myzus persicae* (Homoptera: Aphididae). **Proceedings of the Royal Society of London Biological Sciences**, London, v. 269, p. 455 – 460, 2002.
- FERERES, A.; SHUKLE, R.H.; ARAYA, J.E.; FOSTER, J.E. Probing and feeding behavior of *Sitobion avenae* (F.) (Hom., Aphididae) on three wheat cultivars infected with barley yellow dwarf virus. **Journal of Applied Entomology**, Berlin, v. 109, p. 29-36, 1990.

FIEBIG, M.; POEHLING, H.M.; BORGEMEISTER, C. Barley yellow dwarf virus, wheat, and Sitobion avenae: a case of trilateral interactions. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Dordrecht, v. 110, p. 11-21, 2004.

FRY, S.M.; MILHOLLAND, R.D. Multiplication and translocation of *Xylella fastidiosa* in petioles and stems of grapevines, resistant, tolerant, and susceptible to Pierce's Disease. **Phytopathology**, Berlin, v. 80, p. 61-65, 1990.

HABERMANN, G.; MACHADO, E.C.; RODRIGUES, J.D.; MEDINA, C.L. CO₂ assimilation, photosynthetic light response curves, and water relations of 'Pêra' sweet orange plants infected with *Xylella fastidiosa*. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v.15, p.79-87, 2003

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

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, p. 1056-1066, 2002.

JOOST, P.H.; BACKUS, E.A.; MORGAN, D.; YAN, F. Correlation of stylet activities by the glassy-winged sharpshooter, *Homalodisca coagulata* (Say), with electrical penetration graph (EPG) waveforms. **Journal of Insect Physiology**, Oxford, v. 52, p. 327 – 337, 2006.

LARANJEIRA, F.F.; BERGAMIN FILHO, A.; AMORIM, L.; BERGER, R.D. Aspectos práticos da epidemiologia da clorose variegada dos citros. **Laranja**, Cordeirópolis, v. 19, p. 79-90, 1998.

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 the causal agent. **Summa Phytopathologica**, Jaguariuna, v.19, n. 2, p. 123-125, 1993.

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

MACHADO, M.A.; CARUSO, E.; QUAGGIO, J.A.; LAGOA, 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, p. 53-57, 1994.

MACHADO, E.C; OLIVEIRA, R.F.; RIBEIRO, R.V.; MEDINA, C.L; STUCHI, E.S.; MARIN, F.R.; SILVA, J.A.B.; SILVA, S.R. Fluxo de seiva e fotossíntese em laranja 'Natal' com clorose variegada dos citros **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.41, n. 6, p.911-918, 2006.

- MARTINS, E.M.F.; GUZZO, S.D.; PALAZZO, D.A.; HARAKAVA, R. Alterações metabólicas constatadas em plantas de laranja Natal infectadas por *Xylella fastidiosa*. **Summa Phytopatologica**, Jaguariuna, v.25, p.288-293, 1999.
- MARUCCI, R.C.; LOPES, J.R.S.; VENDRAMIM, J.D.; CORRENTE, J.E. Influence of *Xylella fastidiosa* infection of citrus on host selection by leafhopper vectors. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Dordrecht, v. 117, p. 95-103, 2005.
- MARUCCI, R.C.; GIUSTOLIN, T.A.; MIRANDA, M.P.; MIQUELOTE, M.; 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, p. 669-675, 2003.
- McLEAN, D.L.; KINSEY, M.G. A technique for electronically recording aphid feeding and salivation. **Nature**, London, v. 203, p. 1358-1359, 1964.
- MINSAVAGE, G.V.; THOMPSON, C.M.; HOPKINS, D.L.; LEITE, R.M.V.B.C.; STALL, R.E. Development of a polymerase chain reaction protocol for detection of *Xylella fastidiosa* in plant tissue. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 84, p. 446-461, 1994.
- MIZELL, R.F. III; FRENCH, W.J. Leafhopper vectors phony peach disease: feeding site preference and survival on infected and uninfected peach, and seasonal response to selected host plants. **Journal of Entomology Science**, Griffin, v.22, p.11-22, 1987.
- MOLLENHAUER, H.H.; HOPKINS, D.L. Xylem morphology of Pierce's disease-infected grapevines with different levels of tolerance. **Physiology Plant Pathology**, London, v. 9, p. 95-100, 1976.
- MONTESINO, L.H. COELHO, J.H.C.; FELIPPE, M.R.; YAMAMOTO, P.T. Ingestão de seiva do xilema de laranjeiras 'pêra' e 'valência' (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) sadias e infectadas por *Xylella fastidiosa*, pelas cigarrinhas vetoras *Oncometopia facialis* e *Dilobopterus costalimai* (Hemiptera: Cicadellidae). **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 28, n. 2, p. 199-204, 2006.
- PURCELL, A.H.; HOPKINS D.L. Fastidious xylem-limited-bacterial plant pathogens. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 34, p. 131-151, 1996.
- QUEIROZ-VOLTAN, R.B.; PARADELA FILHO, O. Caracterização de estruturas anatômicas de citros infectados com *Xylella fastidiosa*. **Laranja**, Cordeirópolis, v. 20, p. 55-76, 1999.
- RAPUSAS, H. R.; HEINRICHS, E. A. Feeding behaviour of *Nephotettix virescens* (Homoptera: Cicadellidae) on rice varieties with different levels of resistance. **Environmental Entomology**, College Park, v. 19, p. 594-602, 1990.

REDAK, R.A.; PURCELL, A.H.; LOPES, J.R.S.; BLUA, M.J., MIZELL, 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**, Stanford, v. 49, p. 243-270, 2004.

RIBEIRO, R.V.; MACHADO, E.C.; OLIVEIRA, R.F. Growth- and leaf-temperature effects on photosynthesis of sweet orange seedlings infected with *Xylella fastidiosa*. **Plant Pathology**, London, v.53, p.334-340, 2004.

ROSSETTI, V. Clorose variegada dos citros (CVC). In: RODRIGUEZ, O.; VIEGAS, F. **Citricultura brasileira**. 2.ed. Campinas: Fundação Cargill, 1991. v. 2. p. 714-721.

ROSSETTI, V.; DE NEGRI, D. Clorose variegada dos citros (CVC): revisão. **Laranja**, Cordeiropolis, v.11, p. 1-14, 1990.

TJALLINGII, W.F. Electronic recording of penetration behavior by aphids. **Entomological Experimentalis et Applicata**, Dordrecht, v. 24, n. 3, p. 721-730, 1978.

TJALLINGII, W.F. Electrical recording of stylet penetration activities. In: MINKS, A.K.; HARREWIJN, P. (Ed) **Aphids: Their Biology, Natural Enemies and Control**. Amsterdam: Elsevier, 1988. p. 95-108.

VAN HELDEN, M.; TJALLINGII, W.F. Experimental design and analysis in EPG experiments with emphasis on plant resistance research. In: (Ed.). WALKER, G.P.; BACKUS, E.A. **Principles and Applications of Electronic Monitoring and Other Techniques in the Study of Homopteran Feeding Behavior**. Lanham: Thomas Say Publications in Entomology, 2000. p.144-171.