

**MULTIPLICAÇÃO E MOVIMENTAÇÃO DE *Xylella fastidiosa*  
EM MUDAS DE *Citrus sinensis* E SUA  
EFICIÊNCIA DE AQUISIÇÃO E INOCULAÇÃO POR VETORES**

**RODRIGO PIACENTINI PAES DE ALMEIDA**

Engenheiro Agrônomo

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

Dissertação apresentada à Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências. Área de Concentração: Entomologia.

PIRACICABA  
Estado de São Paulo – Brasil  
Julho - 1999

Aos meus Pais: **Oslei e Silvia**;

Pela confiança, estímulos,  
dedicação e apoio

## **Dedico**

Aos meus irmãos: **Felipe e Daniel**;

Amigos em todos os momentos, por todas as alegrias  
pelas quais passamos

e

À **Tatiana**,

Pelo amor, carinho, compreensão, paciência e motivação

## **Ofereço**

## AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. João Roberto Spotti Lopes, pela orientação e amizade, por seus ensinamentos, apoio incondicional, confiança e dedicação.

Ao Prof. Dr. Alexander H. Purcell, pelos ensinamentos, discussões e idéias, que muito colaboraram para este trabalho.

Aos Drs. Rui Pereira Leite Júnior e Maria Júlia Gobbo Beretta, pelas discussões que aprimoraram esta pesquisa.

A todos os professores do Curso de Pós-Graduação em Entomologia da ESALQ, pelos ensinamentos transmitidos, exemplos de profissionalismo e cooperação sempre presentes; em especial aos Profs. Dr. José Roberto Postali Parra, Dr. Roberto Antônio Zucchi e Dr. Sérgio Batista Alves, por cederem espaço físico e equipamentos de seus laboratórios.

Aos funcionários do Departamento de Entomologia, pela amizade e colaboração durante o curso.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo pela concessão de bolsa de estudo.

Ao Fundo Paulista de Defesa da Citricultura, pelo suporte financeiro e técnico para o projeto.

Ao Centro de Citricultura “Sylvio Moreira”, em especial ao M.Sc. Helvécio Della Coletta Filho, pelo auxílio técnico.

Aos companheiros de trabalho: Charles, Daniela, Érica, Lídia, Matê, Renata, Rodrigo, Rosângela, Susana e Teresinha; pela amizade, apoio e incentivo, que foram vitais durante o curso e pelo auxílio com meus trabalhos.

Aos amigos Eduardo, Érica, Luciano, Ranyse, Reymar, Rogério e Sandra e aos colegas do CPG – Entomologia da ESALQ/USP, pelos momentos compartilhados.

A todos que direta ou indiretamente auxiliaram neste trabalho.

## SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	viii
SUMMARY.....	x
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1 Clorose variegada dos citros.....	3
2.2 O fitopatógeno, <i>X. fastidiosa</i> .....	4
2.2.1 Isolamento e cultivo em meios de cultura.....	6
2.2.2 Características da colonização de plantas.....	8
2.3 Transmissão de <i>X. fastidiosa</i> por insetos vetores.....	9
2.4. Cigarrinhas vetoras de <i>X. fastidiosa</i> em citros.....	13
2.5. Epidemiologia de doenças causadas por <i>X. fastidiosa</i> .....	14
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	16
3.1 Plantas-teste e insetos utilizados.....	16
3.2 Plantas-fonte.....	17
3.3 Isolamento e quantificação de <i>X. fastidiosa</i> em meio de cultura sólido.....	18
3.4 Comparação de meios de cultura para isolamento primário de <i>X. fastidiosa</i> .....	19
3.5 Teste de inibição do crescimento de <i>X. fastidiosa</i> em meio de cultura na presença de tecido cítrico.....	20
3.6 Eficiência de aquisição de <i>X. fastidiosa</i> por cigarrinhas.....	21
3.7 Eficiência de inoculação de <i>X. fastidiosa</i> por cigarrinhas.....	22
3.8 Multiplicação e movimentação de <i>X. fastidiosa</i> em citros.....	23
4 RESULTADOS.....	26
4.1 Comparação de meios específicos para crescimento de <i>X. fastidiosa</i> .....	26
4.2 Teste de inibição do crescimento de <i>X. fastidiosa</i> em meio de cultura na presença de tecido cítrico.....	27
4.3 Eficiência de aquisição de <i>X. fastidiosa</i> por cigarrinhas.....	28
4.4 Eficiência de inoculação de <i>X. fastidiosa</i> por cigarrinhas.....	29
4.5 Multiplicação e movimentação de <i>X. fastidiosa</i> em citros.....	30

5. DISCUSSÃO.....	37
6 CONCLUSÕES.....	45
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	47

**MULTIPLICAÇÃO E MOVIMENTAÇÃO DE *Xylella fastidiosa***  
**EM MUDAS DE *Citrus sinensis* E SUA**  
**EFICIÊNCIA DE AQUISIÇÃO E INOCULAÇÃO POR VETORES**

Autor: RODRIGO PIACENTINI PAES DE ALMEIDA

Orientador: Prof. JOÃO ROBERTO SPOTTI LOPES

**RESUMO**

A pesquisa teve por objetivo investigar possíveis fatores determinando a baixa eficiência de transmissão da bactéria *Xylella fastidiosa* por cigarrinhas (Hemiptera, Cicadellidae) em citros. Inicialmente, foram adaptadas técnicas para isolamento primário e quantificação de *X. fastidiosa* em citros e no vetores, e para inoculação mecânica do patógeno em mudas cítricas. A seguir, foram conduzidos estudos para avaliar as eficiências de aquisição e inoculação de *X. fastidiosa* por cigarrinhas, bem como a multiplicação e movimentação deste patógeno em mudas cítricas após sua inoculação mecânica. A metodologia de isolamento primário, envolvendo maceração de tecidos infectados em homogeneizador mecânico e plaqueamento da suspensão resultante em meio de cultura, foi eficiente para detecção e quantificação de *X. fastidiosa* em citros. Os meios de cultura PW e PWG, específicos para o crescimento de *X. fastidiosa*, propiciaram diâmetro de colônias de aproximadamente 1 mm aos 14 dias após a inoculação. Outro meio específico testado, BCYE, foi cerca de 60-70% menos eficiente para recuperação do patógeno em isolamento primário que os dois anteriores, gerando colônias menores e de crescimento mais lento. A adição de macerado cítrico à suspensão bacteriana não inibiu o crescimento de *X. fastidiosa* em meio sólido, mas o favoreceu quando comparado a suspensões puras da bactéria. Nenhum dos indivíduos sadios de *Dilobopterus costalimai* e *Bucephalogonia xanthophis*, submetidos a um período de acesso à aquisição de 96 horas em planta-fonte de *X. fastidiosa*, foi positivo para a bactéria pelos testes de cultura e ELISA, indicando baixa eficiência de aquisição dos

vetores. No estudo de eficiência de inoculação, nenhum dos 19 indivíduos infectivos de *Oncometopia facialis* transmitiu *X. fastidiosa* para plantas-teste durante período de acesso à inoculação de 96 horas, sugerindo que a inoculação em citros por vetores também é um processo ineficiente. A multiplicação e movimentação de *X. fastidiosa* em mudas cítricas foi avaliada em períodos sucessivos (1, 2, 4, 8 e 16 semanas) após sua inoculação em caule ou folhas. O método de inoculação mecânica com alfinete entomológico teve eficiência variável de 45 a 100 %. Com apenas 1 semana da inoculação, a bactéria foi isolada de áreas do caule localizadas 4 cm acima e 4 cm abaixo do ponto de inoculação, assim como na primeira folha acima deste; demonstrando o caráter sistêmico de sua infecção em citros. A porcentagem de plantas positivas detectadas com 1 semana após a inoculação não aumentou significativamente nas semanas subsequentes (até 16 semanas); desta forma o sucesso da infecção pode ser diagnosticado precocemente pelo método de isolamento. A população bacteriana nas duas primeiras semanas após a inoculação variou de  $10^3$  a  $10^5$  unidades formadoras de colônias (UFC) por grama de tecido, sendo que no período de 4 a 16 semanas este valor manteve-se entre  $10^4$  e  $10^6$  UFC/g. Sintomas foliares de CVC foram observados 2 meses após a inoculação. Com base em informações oriundas de outro patossistema (doença de Pierce em videira), postula-se que um fator limitante da eficiência de transmissão de *X. fastidiosa* em citros possa ser a baixa eficiência de aquisição do patógeno pelos vetores, decorrente da pequena população bacteriana encontrada em plantas cítricas infectadas.



**MULTIPLICATION AND MOVEMENT OF *Xylella fastidiosa***  
**WHITHIN *Citrus sinensis* AND ITS EFFICIENCY OF**  
**ACQUISITION AND INOCULATION BY SHARPSHOOTER VECTORS**

Author: RODRIGO PIACENTINI PAES DE ALMEIDA

Adviser: Prof. JOÃO ROBERTO SPOTTI LOPES

**SUMMARY**

The main goal of this research was to investigate possible factors determining the low transmission efficiency of *Xylella fastidiosa* by sharpshooter leafhoppers (Hemiptera, Cicadellidae) in citrus. Initially, To techniques to isolate and quantify *X. fastidiosa* population in citrus and vectors, and to needle inoculate the pathogen in the host plant. Studies were then carried out to evaluate the acquisition and inoculation efficiencies of *X. fastidiosa* by leafhoppers, as well as the multiplication and movement of this bacterium in citrus. The isolation and quantification procedure was successfully adapted, being efficient to detect the bacterium in citrus. In the specific media for *X. fastidiosa* growth, PWG and PW, colonies were observed 7-8 days after plating, with a diameter achieving 1 mm after 14 days of incubation, these results are superior to those obtained with BCYE medium, in which colonies were observe 14-15 days after plating with smaller size, this medium also was 60-70 % less efficient in bacterial recovery than the previous two. Homogenized citrus tissue did not inhibit *X. fastidiosa* bacterial growth on solid medium, in fact, it stimulated more colony recovery when compared to pure suspensions of the pathogen. None of the assayed leafhoppers by the diagnostic tests used acquired *X. fastidiosa* in citrus, therefore the acquisition might be an inefficient step of the transmission. About 10 % of the tested insects in the inoculation experiment had *X. fastidiosa* isolated in medium from their heads, but no inoculation was observed, also suggesting inefficient inoculation. The multiplication and movement of *X. fastidiosa* in citrus observations were done after needle inoculation of the pathogen in stems and

leaves of test plants, this method had a 45 - 100 % efficiency. Only 1 week after inoculation the bacterium was recovered in areas above and below the inoculation points, as well as in the first leaf above it. The amount of positive plants 1 week after inoculation remained constant until the end of the assays (16 weeks), therefore, the infection success rate can be early identified. The bacterial population in the first weeks after inoculation varied from  $10^3$  to  $10^6$  colony forming units (CFU) per gram of tissue, after 4 weeks this value remained between  $10^5$  and  $10^6$  CFU/g. Symptoms were observed 2 months after inoculation in all tests done. Based on the Pierce's disease of grapevines pathosystem, possibly the limiting factor to *X. fastidiosa* transmission in CVC is the low acquisition efficiency by vectors , due to the low bacterial population found in symptomatic plants.

## 1 INTRODUÇÃO

A clorose variegada dos citros (CVC), causada pela bactéria *Xylella fastidiosa*, é atualmente uma das principais doenças de citros no Brasil. O patógeno coloniza os vasos de xilema da planta hospedeira, causando redução na produção e qualidade dos frutos (Laranjeira & Palazzo, 1999), sendo a doença de grande importância econômica para a citricultura brasileira, que hoje representa cerca de 30 % da produção mundial da fruta (Neves, 1999).

*X. fastidiosa* causa doenças em diversas plantas cultivadas, especialmente árvores frutíferas e ornamentais, sendo disseminada naturalmente por cigarrinhas sugadoras de seiva do xilema (Hemiptera: Cicadellidae e Cercopidae) (Purcell & Hopkins, 1996). Apesar de algumas características da transmissão serem conhecidas, tais como eficiência, local de retenção do inóculo, período latente e persistência no vetor, detalhes sobre o mecanismo de inoculação são desconhecidos (Purcell & Hopkins, 1996).

No caso da CVC, a eficiência de transmissão observada para algumas espécies vetoras variou de 1 a 12 % (Krügner et al., 1998). Estes valores são baixos se comparados aos obtidos (> 90 %) para a doença de Pierce (Pierce's Disease - PD) em videira na Califórnia (Purcell & Finlay, 1979). Assumindo-se que o mecanismo de transmissão do patógeno seja semelhante nos dois patossistemas, surgem dúvidas com relação ao(s) fator(es) determinando a diferença na eficiência de transmissão.

De maneira geral, três etapas devem ser bem sucedidas para que ocorra a transmissão de um fitopatógeno por um inseto vetor: a) aquisição; b) inoculação; e c) desenvolvimento da infecção após a inoculação do patógeno na planta hospedeira. A associação desses fatores, ou apenas um fator isolado, pode estar reduzindo a eficiência

de transmissão de *X. fastidiosa* por cigarrinhas em citros. A determinação do fator limitante depende da avaliação do sucesso de cada uma das etapas do processo de transmissão.

Nesta dissertação, testou-se a hipótese de que as baixas taxas de transmissão por vetores no patossistema CVC são devidas a uma baixa taxa de sobrevivência de infecções iniciais de *X. fastidiosa* em citros ou, alternativamente, a uma baixa probabilidade de aquisição e/ou inoculação da bactéria pelas cigarrinhas. Entretanto, a adaptação de técnicas para a realização destes estudos é necessária, uma vez que métodos diagnósticos de *X. fastidiosa* em citros não têm sido adequados para detecção da bactéria nas cigarrinhas. Da mesma forma, o método de isolamento primário do patógeno, visando a obtenção de dados quantitativos de sua multiplicação em citros, bem como a técnica de inoculação mecânica no hospedeiro, necessitam ser aprimorados.

Assim, os objetivos desta pesquisa foram: a) adaptar uma técnica para isolamento e quantificação de *X. fastidiosa* em citros; b) comparar meios de cultura quanto à eficiência de isolamento primário desta bactéria; c) estabelecer uma técnica eficiente para inoculação mecânica de *X. fastidiosa* em citros; d) avaliar a sobrevivência, multiplicação e movimentação deste patógeno após sua inoculação na planta; e e) avaliar as eficiências de aquisição e de inoculação de *X. fastidiosa* em citros por cigarrinhas.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Clorose Variegada dos Citros

Em 1987, nas regiões norte e sudoeste dos Estados de São Paulo e Minas Gerais respectivamente, plantas de laranja doce (*Citrus sinensis*, L. Osbeck) foram observadas com sintomas de clorose foliar e presença de pequenos frutos; em função destes e outros sintomas característicos, sugeriu-se a denominação ‘Clorose Variegada dos Citros’ (CVC) para a moléstia (Rossetti et al., 1990). Inicialmente, especulava-se que a CVC estivesse unicamente associada a deficiências nutricionais; sua associação com redução do nível de nutrientes na planta foi determinada (Malavolta & Prates, 1994). Entretanto, em 1990, bactérias foram observadas nos vasos de xilema folhas de citros sintomáticas, sugerindo que um microrganismo era o agente causal da CVC (Rossetti et al., 1990).

Três anos de pesquisa foram necessários, após esta constatação, para que o agente etiológico da CVC fosse identificado, com o fechamento dos postulados de Koch por dois grupos independentes (Chang et al., 1993 e Lee et al., 1993). A partir da identificação da bactéria restrita ao xilema *Xylella fastidiosa* Wells et al. 1987 como causadora da CVC, iniciou-se uma nova fase na pesquisa da doença, uma vez que estudos começaram a ser dirigidos ao fitopatógeno e suas associações com o hospedeiro e vetores. Todas as variedades de laranja doce cultivadas mostraram-se suscetíveis à bactéria (Li, 1997), ressaltando a importância econômica da CVC. Segundo Neves (1999), o Brasil é o maior produtor e exportador mundial de citros e seus derivados, representando cerca de 30 % da produção mundial de laranja. Em 1997, a CVC já infestava 34 % das plantas do Estado de São Paulo, com perdas estimadas em

150 milhões de dólares naquele ano (Amaro et al., 1997). Melhores técnicas de manejo da CVC são portanto necessárias, considerando-se o grande potencial de dano econômico e social da doença.

Em 1996, a existência de insetos vetores para disseminação natural de *X. fastidiosa* em citros foi comprovada (Lopes et al., 1996 e Roberto et al., 1996). Neste período, alternativas de manejo da doença baseadas em poda de ramos infectados e controle de vetores foram introduzidas no setor produtor de citros (Gravena et al., 1997 e Carlos et al., 1997).

A partir de iniciativa da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), iniciou-se em 1997 um programa para sequenciamento do genoma da *X. fastidiosa* (Bonalumé, 1997). O conhecimento completo do genoma de *X. fastidiosa* provavelmente irá auxiliar na compreensão das interações deste fitopatógeno com seus hospedeiros e vetores, podendo resultar no desenvolvimento de técnicas inovativas de controle da CVC.

## **2.2 O fitopatógeno, *X. fastidiosa***

A primeira doença causada por *X. fastidiosa* a ser relatada foi a de Pierce ('Pierce's Disease' - PD) em videira na Califórnia, EUA, no final do século XIX (Pierce, 1892). Durante oitenta anos acreditou-se que o patógeno era de origem viral, por suas características de transmissão, uma vez que é transmitido por enxertia e insetos vetores, além dos sintomas de necrose marginal em folhas (Winkler, 1949). Porém, a remissão de sintomas em plantas tratadas com tetraciclina foi uma evidência indireta da presença de uma bactéria como agente causal (Hopkins & Mortensen, 1971), a qual posteriormente foi visualizada através de microscopia nos vasos de xilema de plantas sintomáticas (Hopkins & Mollenhauer, 1973). A partir do primeiro isolamento dessa bactéria em meio de cultura (Davis et al., 1978), outras doenças foram diagnosticadas tendo *X. fastidiosa* como agente causal (Purcell, 1997).

Inicialmente encontrada apenas no continente americano, relatos de sua presença na Ásia (Leu & Su, 1993) e Europa (Berisha et al., 1998) demonstram uma distribuição

mais global da bactéria. Devido ao desenvolvimento de novas técnicas moleculares para sua detecção e ao fato de que em muitas plantas não cause sintomas evidentes, acredita-se que ocorra um incremento no número de moléstias documentadas causadas pelo patógeno (Purcell, 1997).

*X. fastidiosa* é uma bactéria gram-negativa, restrita aos vasos de xilema de seus hospedeiros e disseminada através de insetos vetores, que são cigarrinhas sugadoras da seiva do xilema de plantas, pertencentes às famílias Cicadellidae (subfamília Cicadellinae) e Cercopidae (Purcell & Hopkins, 1996). Essa bactéria sobrevive apenas em dois ambientes, xilema de hospedeiros vegetais e no lúmen do canal alimentar anterior (estomodéu e estiletos) dos insetos vetores, onde, curiosamente, as condições são extremas para a sua sobrevivência. Baixa concentração de nutrientes disponíveis, alta turbulência e pressão são características dos vasos do xilema de plantas e do canal alimentar dos vetores (Raven, 1984). Assim, acredita-se que a adesão do organismo a um substrato, planta ou inseto, seja vital para sua existência devido a estas condições (Davis et al., 1981b e Hopkins, 1989).

Hill & Purcell (1995b) reuniram dados sobre hospedeiros de *X. fastidiosa* na Califórnia, verificando que 94 das 151 espécies vegetais testadas, de mais de 20 famílias, foram positivas quanto à presença da bactéria, demonstrando sua baixa especificidade em relação a hospedeiros. Outras bactérias fitopatogênicas, como alguns patovares do gênero *Xanthomonas*, podem infectar apenas uma espécie vegetal (Vauterin et al., 1995).

Purcell (1997) listou plantas cultivadas nas quais *X. fastidiosa* é patogênica, sendo a maioria dos hospedeiros espécies arbóreas e perenes, como citros, videira, ameixeira e carvalho. Entre culturas herbáceas, são relatadas vinca (*Catharanthus roseus*) e apenas uma espécie anual, a alfafa. Provavelmente, habitar espécies perenes e ser pouco específica confere maiores chances ao patógeno de manter-se no ambiente em períodos desfavoráveis, como no inverno ou entressafra.

Apesar de ser um gênero monotípico, relatos demonstraram grande variação na gama de hospedeiros, patogenicidade, características moleculares e padrões de crescimento em meio de cultura entre estirpes, sugerindo que ao menos subespécies de

*Xylella* existam (Purcell & Hopkins, 1996). Mesmo colonizando vários hospedeiros, patogenicidade cruzada entre espécies hospedeiras pode não ocorrer. Estirpes causadoras de doença em elmo (*Ulmus americana*), por exemplo, não produziram sintomas em plátano (*Platanus occidentalis*), assim como estirpes de plátano foram inofensivas ao elmo Sherald (1993). Pooler & Hartung (1995) compararam, através de ‘random amplified polymorphic DNA’ (RAPD), 11 isolados provenientes de 7 hospedeiros diferentes, constatando grande variação genética entre os materiais e identificando 5 grupos de *X. fastidiosa*. Rosato et al. (1998), utilizando técnica semelhante também observaram variação entre estirpes. Uma grande variabilidade fisiológica entre estirpes tem sido evidenciada pelas diferenças observadas no tempo de surgimento de colônias em meio de cultura; este período de incubação tem variado de 6 dias para estirpes de videira (Davis et al., 1978), 9 dias estirpes de para citros (Chang et al., 1993) e 14 dias para a estirpe de pereira (Leu & Su, 1993).

### **2.2.1 Isolamento e cultivo em meios de cultura**

A partir do primeiro relato do cultivo da bactéria em meio de cultura JD (Davis et al., 1978), outros meios foram desenvolvidos tais como PD2 (Davis et al., 1980), PW (Davis et al., 1981a), PWH (Lee et al., 1993), SPW (Hartung et al., 1994) e PWG (Hill & Purcell, 1995a). Apenas pequenas modificações relacionadas à composição, quantidade de reagentes e troca de gelificantes foram realizadas em relação ao meio original. O meio BCYE (Wells et al., 1981), apesar de possuir composição diferente, possui fontes alternativas de nutrientes dos demais meios. Posteriormente, o meio CS20 foi desenvolvido, tendo vantagem sobre os demais por ser totalmente autoclavável (Chang & Walker, 1988).

Chang & Donaldson (1993) isolaram *X. fastidiosa* em meio quimicamente definido, mantendo crescimento e período de incubação semelhantes aos meios PD2 e CS20. O conhecimento da composição do meio de cultura pode auxiliar estudos sobre as necessidades nutricionais da bactéria, possibilitando melhor compreensão de seu



metabolismo. Chang et al. (1990) obtiveram crescimento bacteriano em ágar nutriente para uma estirpe de PD. Uchibaba et al. (1992) compararam crescimento de estirpe de ameixeira em ágar nutriente e outros meios, observando para o primeiro eficiência de isolamento inferior ao BCYE.

Aparentemente, alguns reagentes presentes nos meios para *X. fastidiosa*, tais como soro de albumina bovina, carvão ativado e amido de batata, favorecem o crescimento bacteriano mas não são essenciais (Davis et al., 1978), agindo possivelmente na desintoxicação do meio, sequestrando compostos inibidores provenientes do meio ou de tecidos de hospedeiros durante isolamentos primários (Davis et al., 1978; Wells et al., 1981 e Chang & Donaldson, 1993). Fontes de ferro, tais como pirofosfato férrico e cloreto de hemim, também presentes nos meios, não são essenciais à bactéria, mas estimulam seu crescimento (Chang & Donaldson, 1993).

Poucas informações existem sobre a eficiência dos meios específicos para a estirpe causadora da CVC. O primeiro isolamento de citros foi realizado por Leite Jr. & Leite (1991), utilizando o meio BCYE, mas informações sobre sua performance não foram relatadas. Para fechamento dos postulados de Koch, foram utilizados os meios PW e PWH (Chang et al., 1993 e Lee et al., 1993), observando-se, grande variação no período de incubação para surgimento de colônias (9 a 20 dias). Posteriormente, desenvolveu-se o meio SPW, adicionando-se substâncias existentes em extratos de tecido cítrico macerado Hartung et al. (1994). Este meio foi comparado com PD2, mostrando-se superior; o diâmetro de colônias após 21 dias (0,35-0,36 mm) foi inferior a algumas estirpes de *X. fastidiosa* testadas mas superior a outras testadas.

Em geral, os métodos atualmente usados para extração de *X. fastidiosa* de citros são de baixa eficiência, apresentam elevados índices de contaminação e não permitem quantificação da população bacteriana no tecido vegetal amostrado. A quantificação em meio de cultura pode ser realizada através da contagem de unidades formadoras de colônia (UFC) em suspensão com peso de tecido e volume de tampão conhecidos. Hopkins (1985) quantificou *X. fastidiosa* em videira, macerando pecíolos sintomáticos (previamente esterelizados superficialmente), filtrando a suspensão obtida com gaze,

centrifugando-a para concentração da bactéria, resuspendendo o material resultante e plaqueando a suspensão em meio sólido. Através de método semelhante, Fry & Milholland (1990) estudaram a multiplicação e translocação da bactéria em variedades de videira. Apesar de ambos os métodos quantificarem a bactéria, os procedimentos são trabalhosos e sujeitos a desuniformidade no processamento de cada amostra. Além disso, a sensibilidade desses métodos é cerca de 100-1000 vezes menor que a de outro método posteriormente descrito (Hill & Purcell, 1995a). Com esterilização superficial, picagem e homogeneização de tecidos em 'polytron', e posterior plaqueamento da suspensão resultante, Hill & Purcell (1995 a, b) conseguiram detectar populações de  $10^9$  UFC/g de *X. fastidiosa* em videira, com uma sensibilidade teórica de  $10^3$  células por grama de tecido amostrado.

### **2.2.2 Características da colonização de plantas**

Observações microscópicas de plantas com sintomas de CVC demonstraram a presença de bactérias colonizando vasos de xilema (Chagas et al., 1992). As células foram observadas forrando a parede dos vasos ou no lúmen destes, sempre envolvidas por uma matriz também chamada de 'glycocalyx', constituída provavelmente de exopolissacarídeos. A associação de *X. fastidiosa* e 'glycocalyx' é constante em todos os hospedeiros analisados (Purcell & Hopkins, 1996). Davis et al. (1981b) e Hopkins (1989) sugeriram que esta matriz funcione como proteção nas condições do xilema das plantas, além de poder facilitar a nutrição das colônias de *X. fastidiosa*. Acredita-se que a matriz auxilie na adesão bacteriana sob as condições extremas do xilema, proporcionando condições para sua colonização (Purcell & Hopkins, 1996).

Exopolissacarídeos são essenciais para colonização de hospedeiros por *Ralstonia solanacearum*, outra bactéria habitante do xilema de plantas. Araud-Razou et al. (1998) demonstraram que estirpes virulentas deste patógeno produzem exopolissacarídeos na planta infectada, enquanto que estirpes avirulentas não produzem.

O estudo demonstra que os exopolissacarídeos estão envolvidos na colonização do tecido vascular, embora sua função ainda não seja conhecida.

Características da multiplicação e movimentação de *X. fastidiosa* em videira foram estudadas por Hopkins (1985), Fry & Milholland (1990) e Hill & Purcell (1995b). Videira foi a única planta cultivada suscetível em que tais observações foram realizadas. Rápida movimentação em tecidos, assim como altas populações bacterianas detectáveis por isolamento em cultura após uma semana da inoculação mecânica do patógeno, foram características observadas nestes trabalhos. Populações de  $10^9$  UFC/g foram detectadas 4 semanas após a infecção, demonstrando grande multiplicação do patógeno em videira Hill & Purcell (1995b). Cultivares de videira resistentes ou tolerantes à *X. fastidiosa* exibem menor velocidade de movimentação da bactéria, assim como menor quantidade de UFC detectáveis (Fry & Milholland, 1990). Comportamento semelhante ocorre na comparação de estirpes virulentas e avirulentas, ou seja, estirpes avirulentas possuem menor população e movimentação limitada na planta (Hopkins, 1985).

Purcell & Saunders (1999) realizaram extenso trabalho com 31 espécies vegetais na região norte da Califórnia, EUA, avaliando a infecção por *X. fastidiosa* nestes hospedeiros. Variações relacionadas à população bacteriana, movimentação e sobrevivência da infecção através do tempo foram identificadas. Foram observados três tipos de hospedeiros com base nas características da colonização por *X. fastidiosa*; a) propagativos e não propagativos, b) sistêmicos e não sistêmicos e c) patogênicos e não patogênicos. Em alguns hospedeiros, como *Salix lasiolepis*, a bactéria foi recuperada por isolamento em meio de cultura 1 semana após a inoculação por cigarrinhas; entretanto, isto não ocorreu em nenhuma planta testada após 12 semanas da inoculação, demonstrando que estudos mais detalhados sobre a colonização de hospedeiros por *X. fastidiosa* devem ser executados para conhecer-se as características de colonização e definição do tipo de hospedeiro.

### 2.3 Transmissão de *X. fastidiosa* por insetos vetores

A disseminação natural de *X. fastidiosa* é dependente de insetos vetores. Todos os hemípteros sugadores de xilema são considerados vetores potenciais, enquadrando-se neste grupo as cigarrinhas das famílias Cicadellidae (subfamília Cicadellinae) e Cercopidae, além das cigarras (Cicadidae) (Purcell & Hopkins, 1996). Embora ocorra baixa especificidade relacionada às espécies vetoras, tem sido relatadas variações na eficiência de transmissão entre estirpes de *X. fastidiosa*, como por exemplo entre as estirpes de citros (CVC) e videira (PD) (Lopes, 1999), pela mesma espécie de cigarrinha em plantas diferentes (Severin, 1949) e também por vetores diferentes na mesma cultura, como em citros (Krüger et al., 1998) ou amendoeira (Purcell, 1980). Essas variações sugerem que, provavelmente, vários fatores estão relacionados à eficiência de transmissão desta bactéria em sistemas patogênicos. A maior quantidade de informações relacionadas à transmissão de *X. fastidiosa* é proveniente do sistema de PD na Califórnia, onde vários estudos foram realizados no intuito de melhor compreender-se o mecanismo de transmissão da bactéria.

Estudando a localização da bactéria no vetor por microscopia eletrônica, Purcell & Finlay (1979) observaram carpetes bacterianos na superfície cuticular do lúmen do estomodéu de cigarrinhas infectivas, principalmente na câmara de sucção ou cibário; células bacterianas também foram constatadas na parte posterior do pré-cibário e na porção anterior do esôfago. Com base nestas observações, Purcell & Hopkins (1996) sugeriram que a bactéria fosse inoculada na planta através de refluxo de seiva presente no estomodéu e não através da saliva como ocorre para muitos fitovírus e mollicutes propagativos em vetores (Nault, 1997 e Fletcher et al., 1998). Bransky et al. (1983), através de microscopia e imunofluorescência detectaram bactérias nas mesmas regiões anteriormente descritas, mas também observaram colonização da cutícula do pré-cibário, anteriormente e posteriormente à válvula pré-cibarial.

A comprovação de que o inóculo é proveniente do estomodéu surgiu da demonstração de que ninfas de cigarrinhas transmitiam a bactéria, mas que após a ecdise

perdiam esta capacidade (Purcell & Finlay, 1979). O forro cuticular do estomodéu de insetos, assim como o do proctodéu, é de origem embrionária ectodérmica, sendo portanto eliminado a cada mudança de ínstar, quando ocorre troca de todo exoesqueleto (tecidos de origem ectodérmica) do inseto imaturo (Daly et al., 1997). Assim, a perda da infectividade das ninfas após a ecdise indica que todo o inóculo transmissível da bactéria encontra-se restrito ao estomodéu.

*X. fastidiosa* não requer período latente para sua transmissão; um período de acesso à aquisição (PAA) de 1 hora em planta infectada, seguido de período de acesso à inoculação (PAI) também de 1 hora em planta sadia, são suficientes para que cigarrinhas realizem a transmissão do patógeno, no caso de PD (Purcell & Finlay, 1979). Aumentos no PAA resultam em maiores eficiências de transmissão (Purcell & Finlay, 1979), possivelmente devido a maior probabilidade das cigarrinhas alimentarem-se de vasos de xilema infectados com a bactéria. Bactérias fitopatogênicas que requerem período latente no vetor para sua inoculação, como o molicute ‘maize bushy stunt phytoplasma’, devem colonizar o vetor por cerca de 20 dias a 25°C para então serem inoculadas novamente em hospedeiro vegetal (Moya-Raygoza & Nault, 1998).

A persistência do patógeno no vetor é outra característica importante da transmissão de *X. fastidiosa* por cigarrinhas. Severin (1949) e Purcell & Finlay (1979) observaram que adultos infectivos continuavam a transmitir durante longos períodos após a aquisição, sugerindo multiplicação do patógeno no inseto para manutenção do inóculo. Posteriormente, confirmou-se a multiplicação de *X. fastidiosa* no vetor *Graphocephala atropunctata*, através de isolamento em meio de cultura da cabeça de cigarrinhas em períodos variáveis após a aquisição da bactéria (Hill & Purcell, 1995a). A quantidade máxima de células encontrada em na cabeça de um inseto infectivo foi  $10^5$  UFC.

A população bacteriana no hospedeiro está diretamente relacionada com a eficiência de transmissão do patógeno por cigarrinhas no patossistema de PD (Hill & Purcell, 1997). Uma quantidade mínima de  $10^4$  UFC/g de tecido de videira é necessária para que ocorra aquisição da bactéria, sendo que populações de *X. fastidiosa* em videira

de  $10^6$  UFC/g de tecido permitem taxas de transmissão de cerca de 50 % e  $10^8$  UFC/g superiores a 90 % para insetos testados em grupos (Hill & Purcell, 1997).

A eficiência de transmissão de *X. fastidiosa* é dependente de vários fatores, incluindo eficiência de aquisição e inoculação, tempo dispendido pelo vetor alimentando-se em tecido infectivo, taxa de infectividade natural da população de cigarrinhas e sobrevivência de infecções iniciais (Purcell, 1981). A variação em um desses fatores pode causar efeitos drásticos nas taxas de transmissão, podendo explicar as diferenças em eficiência entre espécies vetoras num mesmo hospedeiro.

Grande variação tem sido observada na eficiência de transmissão de *X. fastidiosa* por cigarrinhas entre patossistemas. Na CVC, as taxas de transmissão variaram de 1,3 a 11,7 % (Krügner et al., 1998); enquanto que em PD, valores maiores que 90 % são obtidos com 48 horas de PAI (Purcell & Finlay, 1979). Obviamente existem várias diferenças entre os dois patossistemas, tais como planta hospedeira, estirpes do patógeno, espécies de vetores, condições climáticas e outros fatores, além dos métodos experimentais. Portanto, resultados obtidos em um sistema não devem ser considerados como verdadeiros para os demais, apesar das semelhanças aparentes.

Características comportamentais e alimentares de vetores podem ser as razões para grandes variações nas eficiências entre espécies numa mesma planta hospedeira. Tecidos vegetais preferenciais para alimentação, como folha e ramos, variam entre espécies de cigarrinhas (Gravena et al., 1997). Populações bacterianas também variam na planta (Hopkins, 1981), podendo este também ser um fator relevante para a taxa de transmissão de cada cigarrinha. Além disso, estes insetos podem não alimentar-se exclusivamente da seiva de xilema; Day et al. (1952), demonstraram que a eficiência de transmissão de alguns fitopatógenos está relacionada a frequência de inserções do estilete em tecidos infectados, portanto o comportamento alimentar dos insetos pode afetar as taxas de transmissão.

Um aspecto, ainda não estudado com o intuito de comparar taxas de transmissão de *X. fastidiosa* seriam diferenças estruturais no estomodéu entre espécies de cigarrinhas, as quais poderiam afetar a inoculação. Tavella & Arzone (1993) demonstraram existir

variações morfológicas no estilete de grupos distintos de cicadelídeos, mas estudos similares não foram realizados para cicadelíneos. Adicionando-se a esta limitação, existe ainda o fato de não se conhecer o mecanismo de inoculação da bactéria no hospedeiro. A hipótese vigente é que ocorra refluxo de seivado estomodéu para a planta, durante a alimentação da cigarrinha, através do qual células bacterianas provenientes do vetor atingiriam o xilema (Purcell & Hopkins, 1996). Entretanto, o modelo de inoculação pode ser semelhante ao de luteovírus por afídeos, no qual a salivação preliminar à ingestão de seiva pelo inseto, conduz o patógeno ao tecido a ser infectado (Prado & Tjallingii, 1994). Para esta hipótese ser verdadeira, o canal salivar deve fundir-se com o alimentar em área anterior ao término do estilete, devendo também ocorrer inóculo e/ou colonização de *X. fastidiosa* nesta região dos estiletos.

#### **2.4 Cigarrinhas vetoras de *X. fastidiosa* em citros**

Cerca de 20 espécies de Cicadellinae, potencialmente vetoras de *X. fastidiosa* em citros, foram coletadas em pomares no Estado de São Paulo (Yamamoto, 1998). Entretanto, apenas cinco espécies foram identificadas como vetoras até o momento: *Dilobopterus costalimai*, *Oncometopia facialis*, *Acrogonia* sp., *Bucephalogonia xanthopis* e *Plesiommata corniculata* (Lopes et al., 1996; Roberto et al., 1996 e Krüger et al., 1998). Períodos de incubação para expressão de sintomas após a inoculação por cigarrinhas foram maiores que 5 meses (Lopes et al., 1996), dificultando a experimentação com vetores devido à necessidade de manutenção de plantas-teste por longos períodos sob condições protegidas.

Poucas são as informações sobre a biologia e ecologia destes insetos. Almeida & Lopes (1999) estudaram a duração da fase ninfal de *D. costalimai* e *O. facialis*, obtendo 65 e 76 dias de duração, respectivamente. Entretanto, uma alta mortalidade de imaturos (>65 %), foi observada, principalmente no primeiro instar, demonstrando que o método de confinamento de ninfas utilizado no estudo talvez não tenha sido adequado.

Variação entre tecidos preferenciais para alimentação de cada cigarrinha também foi observada. Yamamoto & Roberto (1997) descrevem que *Acrogonia* sp. prefere folhas de brotações jovens, enquanto *D. costalimai* alimenta-se preferencialmente de ramos novos e *O. facialis* de ramos já lenhosos. Estes insetos têm sido observados alimentando-se de inúmeras espécies vegetais, preferencialmente de plantas arbóreas ou arbustivas (Lopes et al., 1998).

A eficiência de transmissão de *X. fastidiosa* por essas cigarrinhas é baixa, sendo que *O. facialis*, *Acrogonia* sp., *P. corniculata*, *D. costalimai* e *B. xanthophis* transmitem com as taxas individuais de 1,3; 2,3; 2,9; 5,5 e 11,7 %, respectivamente (Krügner et al., 1998). As variações nestes valores podem estar relacionadas ao comportamento de cada espécie, uma vez que preferem tecidos diferentes do hospedeiro para alimentação. A frequência com que cada cigarrinha alimenta-se do xilema em relação à outros tecidos, a quantidade de seiva ingerida e quantidade de inóculo existente em cada região da planta podem ser alguns dos fatores interagindo na eficiência de transmissão.

A flutuação populacional das cigarrinhas em pomares é maior durante o verão e outono (Yamamoto, 1998); porém, maior atividade dos insetos ocorre na primavera e verão (Roberto, 1998). A quantidade de cigarrinhas presentes em citros varia entre anos de amostragem, possivelmente devido a variações climáticas, uma vez que a intensidade de brotações nas plantas cítricas não correlaciona-se à população de insetos no campo (Roberto, 1998).

## **2.5 Epidemiologia de doenças causadas por *X. fastidiosa***

Apesar da diversidade de doenças causadas por *X. fastidiosa*, apenas PD foi estudada detalhadamente com relação a aspectos epidemiológicos de sua disseminação (Purcell & Hopkins, 1996). Para a CVC, apenas a evolução temporal e espacial de sintomas no campo foi analisada, observando-se que a disseminação é principalmente secundária, tendo como fonte de inóculo principalmente pomares vizinhos infectados (Laranjeira et al., 1997). Entretanto, necessita-se ainda estudar o efeito da associação



deste fator com a população de vetores, infectividade natural, probabilidade de transmissão e população da bactéria em citros em diferentes épocas do ano sobre a disseminação dessa doença, para melhor compreender sua epidemiologia.

Purcell (1974) observou que maior incidência de PD ocorria numa faixa de cerca de 100 metros de vinhedo, ao lado de matas ciliares típicas da região. Posteriormente, Purcell (1975) analisou a distribuição espacial de uma cigarrinha vetora, *G. atropunctata*, do início da primavera ao final do verão, concluindo que na primavera ocorria maior concentração de insetos próximos às áreas de mata, enquanto que no final do verão, ocorria maior distribuição no vinhedo. Além disso, ocorreu incremento na população de insetos infectivos até o término do verão. O modelo observado, sugeria ocorrência de disseminação primária da doença, mas não de secundária. Embora com o final do verão ocorresse uma distribuição mais homogênea de cigarrinhas no vinhedo, assim como uma maior infectividade natural dos insetos, as plantas sintomáticas mantinham-se, de maneira geral, limitadas às plantas próximas à mata ciliar (Purcell, 1974).

A constatação de que infecções de PD são sensíveis a invernos rigorosos (Purcell, 1977), explica a ausência de disseminação secundária nos vinhedos, já que provavelmente, poucas infecções tardias sobrevivem o inverno da região (Purcell, 1979). A identificação de plantas hospedeiras de *G. atropunctata* na mata ciliar de Napa Valley (Winkler, 1949), assim como de hospedeiros alternativos de *X. fastidiosa* que serviam de inóculo do patógeno para cigarrinhas durante todo o ano (Purcell & Saunders, 1999), tem permitido um manejo racional de PD. Atualmente, a substituição de hospedeiros do vetor e do patógeno vem sendo realizadas nas matas ciliares dos vinhedos, promovendo a redução no nível de PD em Napa Valley (Replacing..., 1997).

Apesar da disseminação da CVC ser predominantemente de plantas de citros para citros, dentro do pomar, estudos para identificação de hospedeiros alternativos de cigarrinhas e de *X. fastidiosa* devem ser realizados, face à importância potencial que esses hospedeiros possam ter na epidemiologia da CVC, como reservatórios de vetores e inóculo do patógeno.

### **3 MATERIAL E MÉTODOS**

Os estudos foram conduzidos no Laboratório de Insetos Vetores (LV) e casas de vegetação do Departamento de Entomologia, Fitopatologia e Zoologia Agrícola da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ) / Universidade de São Paulo (USP).

#### **3.1 Plantas-teste e insetos utilizados**

Mudas sadias de laranja doce (*Citrus sinensis*, L. Osbeck), variedades ‘Caipira’ e ‘Pineapple’ obtidas a partir de sementes, foram utilizadas como plantas-teste nos experimentos. As plantas, inicialmente em tubetes, foram transplantadas para sacos plásticos de 1 l, com substrato constituído de solo (50 %), esterco bovino (25 %) e areia (25 %). Após o transplante, as mudas ficaram 2 a 4 semanas em repouso antes de serem utilizadas, para assegurar-se o enraizamento apropriado das mesmas. Regas diárias foram realizadas, evitando-se estresse hídrico antes e durante a realização dos ensaios. As plantas utilizadas nos ensaios foram mantidas em casa de vegetação com temperatura controlada (20-32 °C), monitorada com registrador de temperatura e umidade computadorizado (Hobo H08-003-02, Tracon S.A., São Paulo, SP).

As cigarrinhas testadas quanto à eficiência de inoculação de *Xylella fastidiosa* foram coletadas com o uso de rede entomológica, em pomares de laranja na região citrícola de Bebedouro, SP, durante os meses de fevereiro a maio de 1999. Os insetos coletados eram transferidos para brotações de mudas de laranja sadias,

cobertas por saco de tecido vaporoso ‘voil’; o qual permitia aeração e manutenção da temperatura ambiente durante o transporte até a ESALQ.

Já as cigarrinhas utilizadas para determinação da eficiência de aquisição de *X. fastidiosa* em citros, para não serem infectivas, foram criadas a partir de ovos ou ninfas (Purcell & Finlay, 1979), em caixas de criação (50x60x70 cm) com duas paredes de vidro e duas de ‘voil’ e tampa de vidro. Posturas foram obtidas em casa de vegetação, através de confinamento de adultos de cigarrinhas sobre mudas cítricas sadias cobertas com saco de ‘voil’. Folhas com posturas eram destacadas, colocadas em placas de Petri e incubadas a 25 °C, com o pecíolo envolvido em um chumaço de algodão umedecido para manutenção da turgescência (Almeida & Lopes, 1999). Logo após a eclosão, as ninfas foram transferidas para desenvolvimento em mudas sadias de laranja e boldo (*Pneumus boldus*), no interior das caixas de criação. A transferência das cigarrinhas para a colônia de criação foi realizada colocando-se a placa de Petri sobre o solo no vasos, em contato com a base das plantas hospedeiras; as ninfas então passavam à planta. Criações também foram iniciadas diretamente com ninfas coletadas em arbustos de boldo, nas dependências da ESALQ/USP.

### 3.2 Plantas-fonte

As plantas-fonte de *X. fastidiosa* utilizadas nesta pesquisa foram obtidas de material remanescente de ensaios de transmissão de *X. fastidiosa* por cigarrinhas realizados pelo LV (Krügner et al., 1998). As plantas-fonte para aqueles ensaios foram gentilmente cedidas por W. Li (Estação Experimental de Citricultura de Bebedouro), tendo sido inoculadas através de enxertia, com material vegetativo proveniente da região de Bebedouro, SP. A presença de bactéria viável nestas plantas-fonte foi confirmada através de rotineiros isolamentos em meio de cultura (item 3.3). Tais plantas serviram como inóculo para aquisição de *X. fastidiosa* por cigarrinhas em todos os ensaios executados.

### 3.3 Isolamento e quantificação de *X. fastidiosa* em meio de cultura sólido

Adaptou-se a metodologia descrita por Hill & Purcell (1995a) para isolamento e quantificação de *X. fastidiosa* em citros. O método de isolamento resumiu-se às seguintes etapas:

- a) coleta da amostra e eliminação do excesso de tecido vegetal (limbo foliar e acúleos);
- b) pesagem da amostra, macerando-se 0,05 a 0,10 g de tecido;
- c) esterilização superficial do tecido selecionado, através de banhos sucessivos de 2 min em cinco recipientes contendo, respectivamente, álcool, hipoclorito de sódio, água, água e água;
- d) picagem da amostra em seções de aproximadamente 0,1 mm de comprimento sobre papel de filtro autoclavado;
- e) transferência para tubos de ensaio com 2 ml de tampão fosfato salino (PBS);
- f) homogeneização em triturador de tecidos com haste giratória (modelo MA102, Marconi S.A., Piracicaba, SP) a 25.000 rpm por 15 s;
- g) plaqueamento de 20 µl da suspensão obtida em meio de cultura sólido;
- h) incubação a 28 °C por 14 dias.

Todos os materiais, líquidos e recipientes, utilizados no procedimento eram autoclavados por 20 min a 121°C, para eliminação de contaminantes. Lâminas para corte e pinças para transferência dos tecidos eram flambadas para cada amostra. Para limpeza e esterilização da haste do homogeneizador entre cada amostra, realizava-se um banho de álcool por 15 s, seguido de dois banhos de 15 s com água destilada autoclavada (Hill & Purcell, 1995a). Duas gotas de 20 µl da suspensão final eram plaqueadas individualmente com ou sem diluição, sobre os meios de cultura. Todas as etapas, com exceção da

maceração, foram executadas em câmara de fluxo laminar (Veco VLFS-09, Campinas, SP).

A quantificação de *X. fastidiosa* era realizada através de contagem de colônias visíveis em estereoscópio (10 aumentos) sobre o meio, 14 dias após o plaqueamento das duas alíquotas de 20 µl da suspensão. A média das duas contagens representava a estimativa do número de unidades formadoras de colônias (UFC) de *X. fastidiosa* por 20 µl de suspensão. O número de UFC por grama de tecido vegetal era então calculado com base no volume inicial da suspensão (2 ml) e no peso inicial da amostra ( $\approx 0,1$  g). Caso diluições fossem utilizadas, faziam-se correções considerando-se os valores das diluições. Colônias de bactérias isoladas foram rotineiramente testadas através de microscopia ótica, 'enzyme linked immunoabsorbance assay' (ELISA) com antisoro policlonal (SANOFI, Diagnostics Pasteur S.A., France) (Garnier et al., 1993) e 'polymerase chain reaction' (PCR) com primers específicos da estirpe de citros (Beretta et al., 1997), para identificação de *X. fastidiosa*. Todas as amostras processadas foram positivas na identificação.

O meio de cultura utilizado nos experimentos, excetuando-se o teste de comparação de meios, foi o PWG (Hill & Purcell, 1995a) Esse meio é uma modificação do meio PW (Davis et al., 1981a), em que 'gelrite' é usado como agente gelificante ao invés de ágar, proporcionando uma redução na quantidade de soro de albumina bovino necessária no meio, tornando-o mais barato. Entretanto, o PWG original foi levemente alterado, reduzindo-se volume de de água 1.000 para 900 ml. Placas de petri de 9 cm de diâmetro foram utilizadas como recipientes do meio sólido.

### **3.4 Comparação de meios para isolamento primário de *X. fastidiosa***

Três meios de cultura específicos de *X. fastidiosa* foram comparados quanto à eficiência de isolamento primário da bactéria em citros: PW (Davis et al., 1981a), PWG (item 3.3) e BCYE (Wells et al., 1981). Os meios foram produzidos como descrito na

literatura. Os parâmetros avaliados foram período de incubação a 28 °C, diâmetro de colônias após 14 e 21 dias do plaqueamento e eficiência de isolamento após 21 dias.

Dez folhas sintomáticas da CVC coletadas de planta fonte foram processadas para isolamento em meio de cultura, conforme descrito no item 3.3. Para cada amostra realizou-se uma diluição de 10 vezes, transferindo-se 200 µl da suspensão original para tubo com 2 ml de PBS. Três alíquotas de 22 µl desta diluição foram plaqueadas em cada meio, para cada amostra. As placas foram envolvidas por parafilme, possibilitando avaliação individual das amostras, e mantidas a  $28 \pm 1$  °C durante todo ensaio. Diariamente as placas eram analisadas, em estereoscópio de 25 aumentos, quanto ao aparecimento de colônias. Através de lente micrométrica acoplada ao microscópio, o diâmetro de 10 colônias em cada amostra foi determinado após 14 e 21 dias do plaqueamento. Após 21 dias de incubação, contou-se o número de colônias para cada repetição (média dos três plaqueamentos), visando-se determinar a eficiência de isolamento de cada meio. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, sendo cada placa considerada uma unidade experimental. O ensaio foi repetido três vezes, sendo que em cada repetição coletaram-se folhas sintomáticas de plantas-fonte distintas. Os dados de eficiência de isolamento (número médio de colônias por placa) foram expressos em porcentagem, considerando-se como padrão (100 %) o valor obtido para cada folha no meio PWG. Os dados de diâmetro médio de colônias foram submetidos à análise de variância, sendo as médias comparadas pelo teste de Tukey ( $\alpha=0,05$ ).

### **3.5 Teste de inibição do crescimento de *X. fastidiosa* em meio de cultura na presença de tecido cítrico**

Compostos liberados durante a maceração do tecido vegetal de plantas podem inibir o crescimento de *X. fastidiosa* em meio de cultura (Purcell & Saunders, 1999). Para testar esta hipótese com tecidos cítricos, comparou-se a eficiência de plaqueamento de suspensões puras de *X. fastidiosa* em relação a suspensões da bactéria homogeneizadas

juntamente com folhas ou ramos sadios de laranja ‘Caipira’. Para isso, foram estabelecidos os seguintes tratamentos; em tubos de ensaio com 2 ml de tampão PBS: A) suspensão de bactéria com adição de fragmentos de caule representantes do último fluxo de crescimento (0,05–0,06 g); B) suspensão de bactéria com adição de pecíolo e nervura central de folhas recém-maduras (0,05–0,06 g); C) suspensão pura homogeneizada e D) suspensão pura não homogeneizada.

As amostras de tecido cítrico foram esterilizadas conforme descrito no item 3.3. Em cada tubo adicionou-se 20  $\mu$ l de suspensão com concentração de  $10^8$  UFC/ml de um isolado obtido de planta-fonte mantida pelo LV. Os tratamentos A, B e C foram homogeneizados por 15 s no triturador de tecidos, enquanto que D foi mantido como controle não homogeneizado. Após a homogeneização, as amostras foram diluídas 100 e 10.000 vezes e duas gotas de 20  $\mu$ l de cada suspensão foram plaqueadas em meio sólido PWG. A contagem do número de UFC foi realizada 14 dias após a inoculação, obtendo-se uma média dos dois plaqueamentos.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com quatro tratamentos e seis repetições. Os dados de número de UFC foram submetidos à análise de variância, sendo as médias comparadas pelo teste de Tukey ( $\alpha=0,05$ ).

### **3.6 Eficiência de aquisição de *X. fastidiosa* por cigarrinhas**

Cigarrinhas sadias das espécies *Dilobopterus costalimai* e *Bucephalogonia xanthophis*, criadas a partir de ovos e ninfas, foram confinadas sobre ramos sintomáticos de planta-fonte de *X. fastidiosa* no interior de gaiolas plásticas retangulares (54x42x12 mm) e transparentes (Gary Plastics Packaging Corp., New York), providas de aberturas circulares cobertas com tecido (‘voil’) para ventilação. A tampa e a base da caixa se fechavam sobre a haste da planta através de dobradiças, havendo espuma na região de contato com o tecido vegetal para vedação (Almeida & Lopes, 1999). Folhas de plantas fonte, localizadas no segmento de ramo onde a aquisição foi realizada, foram avaliadas

quanto à presença de bactéria viável através de isolamento em meio de cultura (item 3.3), possibilitando quantificação da população bacteriana do local de aquisição. Todas as amostras foram positivas quanto à presença de *X. fastidiosa*, com população variando de  $10^4$ - $10^6$  UFC/g.

Dois períodos de acesso à aquisição (PAAs) foram testados, 48 e 96 horas, visando-se um período mínimo para multiplicação do patógeno, se adquirido, no estomodéu do vetor (Hill & Purcell, 1995a); as cigarrinhas foram testadas quanto à infectividade somente após 7 dias do início da aquisição. Assim, após PAAs de 48 e 96 horas, os insetos foram mantidos em mudas cítricas sadias por períodos de 5 e 3 dias, respectivamente. Um total de 9 adultos de *D. costalimai* foram testadas com 48 horas de PAA e 18 com 96 horas; 16 adultos de *B. xanthophis* também tiveram 96 horas de PAA.

Após este período de incubação, os insetos foram submetidos ao teste de isolamento em meio de cultura, de modo semelhante ao descrito no item 3.3, com pequenas modificações. Apenas a cabeça do inseto foi processada, uma vez que o estomodéu localiza-se na mesma, sendo a fonte de inóculo para a transmissão (Purcell & Finlay, 1979). Os insetos foram triturados em 1 ml de PBS ao invés de 2 ml, e uma diluição de 5 vezes da suspensão original foi utilizada para plaqueamento. Duas gotas de 20  $\mu$ l foram plaqueadas para cada amostra. As placas foram avaliadas quanto ao surgimento de colônias de *X. fastidiosa* 14 dias após o plaqueamento.

Material resultante da suspensão original foi transferido para tubos eppendorf e congelados a  $-20$  °C por até 2 meses. Estas amostras foram também processadas por ELISA, com antisoro policlonal (SANOFI, Diagnostics Pasteur S.A., France) (Garnier et al., 1993).

### **3.7 Eficiência de inoculação de *X. fastidiosa* por cigarrinhas**

Grupos de adultos das espécies *D. costalimai* e *Oncometopia facialis*, coletados no campo, tiveram 96 horas de PAA em plantas-fonte mantidas no LV, sendo confinados



em saco de 'voil' em ramos sintomáticos; amostras foliares destes ramos foram regularmente avaliadas por cultura para quantificação de *X. fastidiosa* conforme descrito em 3.3, sendo todas positivas, com população bacteriana variando de  $10^4$ - $10^6$  UFC/g. Após a aquisição, os insetos foram confinados individualmente no caule de mudas de laranja doce sadias (item 3.1), através das gaiolas plásticas descritas em 3.6, para um período de acesso à inoculação (PAI) de 96 horas.

Um total de 225 insetos foram testados, sendo 39 adultos de *D. costalimai* e 186 de *O. facialis*. Entretanto, o longo PAA em plantas debilitadas causou mortalidade de 50–60 % da população em todos os grupos de cigarrinhas colocadas para aquisição; além disso, alguns indivíduos morreram durante o PAI, sendo estas amostras eliminadas.

Ao término da inoculação, as gaiolas foram removidas, marcando-se a área a que o inseto teve acesso com tinta plástica amarela. As plantas inoculadas foram etiquetadas e transferidas para casa de vegetação e mantidas por 2 a 3 meses para incubação da bactéria. As cigarrinhas foram identificadas com numeração correspondente às respectivas plantas inoculadas, possibilitando, assim, uma correlação entre cigarrinhas infectivas e plantas inoculadas que foram positivas para *X. fastidiosa* em testes diagnósticos subsequentes. A infectividade das cigarrinhas foi determinada por isolamento em meio de cultura conforme descrito em 3.6. O material resultante das suspensões originais também foi mantido a  $-20$  °C, para teste de ELISA posterior. As plantas inoculadas foram avaliadas quanto à infecção por *X. fastidiosa* amostrando-se tecidos da área de acesso à inoculação pelas cigarrinhas, as quais foram submetidas ao teste de ELISA ou isolamento em meio de cultura.

### **3.8 Multiplicação e movimentação de *X. fastidiosa* em citros**

Estudou-se a sobrevivência, multiplicação e movimentação de *X. fastidiosa* em citros em três ensaios: A, B e C. A metodologia de isolamento e quantificação em meio

ensaios, excetuando-se os locais de inoculação e pontos amostrados nas plantas-teste. Uma diluição de 100 vezes para todas as amostras também foi realizada, sendo a suspensão obtida plaqueada com descrito em 3.3.

O isolado CVC1-LV, utilizado neste estudo, foi obtido de uma das plantas-fonte mantidas no LV. Este isolado encontra-se depositado na Coleção de Culturas Tropicais da Fundação André Tosello (Campinas, SP), sob o código CCT6570. A inoculação das plantas-teste foi realizada de modo semelhante ao descrito por Hopkins (1985), através de cinco perfurações leves com alfinete entomológico no. 0, sobre uma gota de 2  $\mu$ l de suspensão de CVC1-LV colocada sobre o tecido a ser inoculado; as suspensões foram diluídas e plaqueadas em meio de cultura para quantificação. O isolado foi repicado de 1 a 3 vezes, após o isolamento primário, antes de ser suspenso para inoculação. O pequeno volume de suspensão inoculada advém do fato de que, em testes preliminares, a planta não absorveu maiores volumes de líquido em pouco tempo. Assim, as inoculações foram realizadas nos períodos mais quentes do dia, visando-se acelerar a absorção das gotas de suspensão. Nessas condições, as gotas levaram cerca de 30 s a 5 min para serem absorvidas.

As inoculações foram realizadas no verão, em dezembro de 1998 para o ensaio A e janeiro de 1999 para B e C. Inocularam-se plantas-teste com 15-20 cm de altura, apresentando brotações com crescimento vigoroso. As avaliações de isolamento e quantificação de *X. fastidiosa* nas plantas-teste foram realizadas 1, 2, 4, 8 e 16 semanas após a inoculação, seguindo os procedimentos descritos no item 3.3. Semanalmente, as plantas inoculadas foram também avaliadas quanto ao aparecimento de sintomas de CVC.

No ensaio A, inoculou-se uma suspensão com  $10^6$  UFC/ml no terço apical (último fluxo de crescimento) do caule de 100 plantas-teste. Em cada período de avaliação, foram amostradas 15 a 20 plantas ao acaso, avaliando-se três pontos em cada planta: a) ponto de inoculação (área do caule onde a inoculação foi realizada); b) secção de 1 cm do caule imediatamente acima do ponto de inoculação de inoculação; e c) primeira folha acima desse ponto. No caso de folhas, foram processados o pecíolo (sem

tecido lateral) e nervura central. Na última avaliação (16 semanas), uma folha adicional a 25–30 cm acima do ponto de inoculação foi avaliada.

Outro experimento com inoculação no caule foi executado (ensaio B), utilizando-se como inóculo uma suspensão de  $10^8$  UFC/ml. Em relação ao ensaio A, foram avaliados dois pontos de amostragem adicionais: d) segmento de caule (1 cm) localizado 4 cm abaixo do ponto de inoculação; e e) secção de caule 4 cm acima desse ponto. Com 16 semanas da inoculação, avaliou-se também uma folha localizada 15 cm acima do ponto de inoculação. Nesse ensaio foram inoculadas 70 plantas, amostrando-se 14 plantas por período de avaliação.

No último ensaio (C), a inoculação foi feita no pecíolo de folha recém madura, com suspensão de  $10^8$  UFC/ml. Três pontos foram avaliados: a) folha inoculada; b) secção de 1 cm do caule acima do ponto de inserção da folha inoculada; e c) secção de 1 cm do caule abaixo deste ponto de inserção. Uma folha 15 cm acima do ponto de inoculação também foi avaliada com 16 semanas após a inoculação. Nesse ensaio inocularam-se 60 plantas-teste, amostrando-se 12 por período de avaliação.

Grupos de plantas-teste sadias foram inoculados com PBS (controles negativos) em todos os ensaios, sendo testadas simultaneamente às plantas inoculadas, usando-se os mesmos procedimentos. Onze folhas sintomáticas foram amostradas após 16 semanas no ensaio A, para determinação da população de *X. fastidiosa* em tecidos sintomáticos. A mediana dos valores de UFC/g de tecido obtidos para cada ponto de amostragem e período, foi utilizada como estimativa da população de *X. fastidiosa* no tratamento.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Comparação de meios específicos para crescimento de *X. fastidiosa*

Os três meios específicos para *X. fastidiosa* testados, PW, PWG e BCYE, promoveram crescimento bacteriano, porém com diferenças na eficiência de isolamento, diâmetro de colônias e período de incubação (Tabela 1). O meio BCYE promoveu crescimento mais lento, colônias menores e menor eficiência de isolamento que PW e PWG. Os meios PW e PWG, que são quimicamente similares, mostraram resultados semelhantes. O PWG apresentou eficiência de isolamento cerca de 11 a 17 % superior ao meio PW nos três ensaios (Tabela 1); o diâmetro de colônias não diferiu entre os meios, exceto no ensaio A, em que as colônias foram significativamente menores no meio PW. Ocorreu redução drástica no diâmetro de colônias no isolamento do ensaio C para ambos os meios, sugerindo a existência de variações entre isolados da bactéria não foram observadas contaminações nas amostras utilizando-se a diluição de 10 vezes da suspensão original.

A população bacteriana detectada nas amostras foi  $10^3$ – $10^6$  UFC/g, demonstrando grande variação entre folhas sintomáticas de plantas-fonte. Estes valores são muito inferiores aos obtidos em videira, que atingiram  $10^9$  UFC/g, pelo mesmo método de isolamento (Hill & Purcell, 1995b). Considerando-se que esta população também ocorra em condições de campo, a baixa eficiência do meio BCYE para isolamento primário pode resultar na obtenção de amostras negativas, que na realidade, são positivas, mas com poucas unidades formadoras de colônias (UFC).

Tabela 1. Características de isolamento primário de *Xylella fastidiosa* de folhas cítricas sintomáticas, em diferentes meios sólidos.

Ensaio	Meio	Período de incubação (dias)	Eficiência relativa de isolamento (%) <sup>1</sup>	Diâmetro médio de colônias (mm)	
				14 dias	21 dias
A	PWG	7-8	100,0	1,17±0,04 a <sup>2</sup>	1,39±0,04 a
	PW	7-8	82,2	0,78±0,02 b	1,09±0,04 b
	BCYE	14-15	32,0	-	0,43±0,02 c
B	PWG	7-8	100,0	-	1,28±0,06 a
	PW	7-8	88,4	-	1,40±0,07 a
C	PWG	7-8	100,0	-	0,49±0,03 a
	PW	7-8	87,9	-	0,46±0,03 a

<sup>1</sup>Taxa calculada considerando-se o número médio de unidades formadoras de colônias (UFC) obtido para o meio PWG como padrão (100 %),

<sup>2</sup> Médias ( $\pm$  EPM) seguidas da mesma letra diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ( $\alpha=0,05$ ),

- observação não realizada.

#### 4.2 Teste de inibição do crescimento de *X. fastidiosa* na presença de tecido cítrico

A adição de tecido cítrico à suspensão de *X. fastidiosa* não inibiu o desenvolvimento de colônias em meio de cultura. Suspensões puras da bactéria tiveram 10 vezes menos UFC detectáveis em meio PWG do que suspensões homogeneizadas com tecido cítrico (Tabela 2). Resultados semelhantes foram obtidos nas suspensões em que se adicionou caule ou tecido foliar (peciolo e nervura central) de citros, demonstrando a

ausência de inibidores de crescimento de *X. fastidiosa* em ambos os tecidos após a homogeneização.

Tabela 2. Efeito da homogeneização de suspensões de *X. fastidiosa* com tecido cítrico na quantificação bacteriana em meio sólido PWG..

Composição do homogeneizado	Quantificação após plaqueamento (log UFC/g/ml $\pm$ EP)
Caule + suspensão	8,33 $\pm$ 0,04 a <sup>2</sup>
Pecíolo e nervura central + suspensão	8,24 $\pm$ 0,05 a
Apenas suspensão	7,25 $\pm$ 0,06 b
Apenas suspensão (controle não homogeneizado)	7,60 $\pm$ 0,07 c

<sup>1</sup>Suspensão de *X. fastidiosa* com concentração de 10<sup>8</sup>UFC/ml de tampão PBS.

<sup>2</sup> Médias ( $\pm$  EPM) seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ( $\alpha=0,05$ ).

A suspensão pura não homogeneizada propiciou maior recuperação de UFC em PWG do que a suspensão homogeneizada. Isto pode ser explicado pelo fato de que, pequenas quantidades de líquido, retidas na haste do homogeneizador durante a lavagem de esterilização, são adicionadas aos tubos de ensaio contendo as amostras, diluindo-se assim, a suspensão a ser homogeneizada. Alternativamente, a diferença observada pode representar mortalidade causada pelo processo de homogeneização.

#### 4.3 Eficiência de aquisição de *X. fastidiosa* por cigarrinhas

Não se detectou *X. fastidiosa* em nenhum dos 27 indivíduos de *Dilobopterus costalimai* e 16 de *Bucephalogonia xanthophis* submetidos aos períodos de acesso à aquisição (PAA) de 48 e 96 horas em plantas-fonte da bactéria. Apesar dos dois métodos de detecção utilizados serem menos sensíveis que PCR (Minsavage et al., 1994),

esperava-se detectar amostras positivas em caso de aquisição da bactéria pelas cigarrinhas, uma vez que o método de cultura foi usado com sucesso por Hill & Purcell (1995a). Este resultado sugere que a eficiência de aquisição de *X. fastidiosa* pelas cigarrinhas em citros é baixa, devendo-se testar um número muito superior de indivíduos para se determinar a taxa de infectividade nesse tipo de estudo.

A criação de *D. costalimai* e *B. xanthophis* a partir de ninfas utilizando-se boldo (*Pneumus boldus*) como planta hospedeira, demonstrou ser eficiente, ocorrendo sobrevivência de ninfas superior a 50 %. Posturas de *D. costalimai* e *B. xanthophis* foram observadas na planta, sugerindo que o boldo possa ser também um hospedeiro de oviposição destas cigarrinhas. Não foi observado se ninfas originárias de posturas realizadas em boldo, ovipositaram quando adultas; caso isto ocorra, esta planta pode ser um hospedeiro eficiente para criação dessas cigarrinhas sob condições controladas. Até o momento, não se conseguiu desenvolver um sistema de criação desses insetos que possibilite a obtenção de grandes números de indivíduos para pesquisa.

#### 4.4 Eficiência de inoculação de *X. fastidiosa* em citros por cigarrinhas

Dos 225 adultos de cigarrinhas (186 *Oncometopia facialis* e 39 *D. costalimai*) submetidos ao PAA de 96 horas em planta-fonte de *X. fastidiosa*, um total de 20 foram positivo por isolamento em meio de cultura ou ELISA. Destes, apenas um foi positivo por ELISA; entretanto, nenhuma colônia foi observada para esta amostra quando isolada em meio de cultura. Dos indivíduos positivos por cultura, 1 foi da espécie *D. costalimai* e aos 18 restantes de *O. facialis*. Apesar da aquisição de *X. fastidiosa* ter sido detectada em alguns indivíduos, nenhuma inoculação foi detectada nas plantas-teste. Estes resultados sugerem que a inoculação de *X. fastidiosa* por cigarrinhas em citros também é um processo ineficiente, uma vez que nenhum dos 20 indivíduos supostamente infectivos (por cultura ou ELISA) transmitiu a bactéria para as plantas-fonte.

Deve-se salientar que as colônias obtidas a partir de cigarrinhas infectivas em meio de cultura, foram pequenas em diâmetro ( $\approx 0,1$  mm), após 14 dias do

plaqueamento, quando comparadas às obtidas de isolamentos de plantas-fonte (Tabela 1). O pequeno tamanho das colônias isoladas de cigarrinhas manteve-se constante mesmo após duas repicagens do isolado primário. Testes de microscopia ótica e PCR com primers específicos para estirpe de *X. fastidiosa* de citros confirmaram tratar-se da bactéria.

#### 4.5 Multiplicação e movimentação de *X. fastidiosa* em citros

Considerando-se todos os ensaios e períodos avaliados, a inoculação mecânica de *X. fastidiosa* utilizada propiciou uma eficiência mínima de infecção de 45 %, atingindo 100 % em um dos períodos avaliados no ensaio B (Tabela 3). Um aumento no número de infecções foi observado entre os ensaios A e B (inoculação em ramos), que tiveram diferentes concentrações de *X. fastidiosa* na suspensão inoculada, sendo que a suspensão de maior concentração (ensaio B) foi mais eficiente para iniciar infecções em citros.

Apesar da porcentagem observada de plantas positivas por cultura não ter atingido valores próximos a 100 % em todas as avaliações, o número real de infecções pode ter sido maior e não detectável pelo método diagnóstico utilizado. Devido à constante presença de contaminantes em suspensões não diluídas, muitas destas amostras foram perdidas, pois os contaminantes alteravam o pH do meio para alcalino (coloração roxa), inibindo o crescimento de *X. fastidiosa*; assim, apenas a diluição de 100 vezes destas amostras estava disponível como resultado; reduzindo a sensibilidade do teste e, possivelmente, a porcentagem de plantas positivas. As taxas de contaminação para suspensões não diluídas foram 12,5, 18,0 e 47,9 %, nos ensaios A, B e C respectivamente; não foram observados contaminantes nas diluições de 100 vezes. Possivelmente, estes contaminantes eram microrganismos endofíticos de citros, ou bactérias oportunistas que teriam penetrado pelos ferimentos da inoculação.

Nos três ensaios, isolou-se bactéria no caule acima do ponto de inoculação, com apenas 1 semana após a inoculação, demonstrando que ocorre multiplicação e movimentação inicial da bactéria em citros (Tabela 3). A movimentação sistêmica de *X.*



Tabela 3. Porcentagem de amostras positivas e populações mínimas e máximas de *Xylella fastidiosa*, por tecido amostrado, em períodos sucessivos após sua inoculação mecânica em mudas de laranja doce (*Citrus sinensis*) em três ensaios.

Ensaio	Semanas após inoculação	Plantas amostradas	% de amostras positivas (log mínimo – máximo UFC/g) <sup>2</sup>							
			n	positivas (%) <sup>1</sup>	Ponto de inoculação	Caulo 0,5 cm acima <sup>3</sup>	1 pecíolo acima <sup>3,4</sup>	Caulo 4 cm abaixo <sup>3</sup>	Caulo 4 cm acima <sup>3</sup>	Caulo 0,5 cm abaixo <sup>3</sup>
A <sup>5</sup>	1	15	66,7	13,3 (4-5)	66,7 (3-5)	0,0	-	-	-	-
	2	20	50,0	10,0 (3-3)	40,0 (3-5)	25,0 (3-6)	-	-	-	-
	4	19	68,4	31,6 (3-6)	63,2 (3-6)	42,1 (4-6)	-	-	-	-
	8	19	73,7	26,3 (3-5)	63,2 (2-6)	47,4 (5-6)	-	-	-	-
	16	15	53,3	13,3 (4-4)	6,7 (5)	53,3 (5-6)	-	-	-	-
B <sup>6</sup>	1	14	78,6	28,6 (3-5)	71,4 (3-6)	14,3 (3-5)	35,7 (3-5)	21,4 (3-5)	-	-
	2	14	92,9	50,0 (4-6)	78,6 (3-5)	64,3 (4-6)	50,0 (3-6)	0,0	-	-
	4	14	100,0	35,7 (3-5)	85,7 (4-6)	78,6 (2-6)	35,7 (3-6)	14,3 (5-6)	-	-
	8	14	57,1	35,7 (3-6)	57,1 (3-6)	57,1 (4-6)	42,9 (4-6)	28,6 (5-6)	-	-
	16	16	87,5	37,5 (2-5)	68,8 (2-5)	68,8 (4-6)	43,8 (2-5)	31,3 (3-5)	-	-
C <sup>7</sup>	1	12	66,7	58,3 (3-4)	0,0	-	-	-	16,7 (2-4)	-
	2	11	45,5	36,4 (3-4)	9,1 (4)	-	-	-	9,1 (4)	-
	4	12	83,3	83,3 (3-6)	0,0	-	-	-	33,3 (4-5)	-
	8	12	75,0	75,0 (4-6)	16,7 (4-5)	-	-	-	50,0 (4-6)	-
	16	11	90,9	90,9 (4-6)	72,7 (3-5)	-	-	-	72,7 (4-6)	-

<sup>1</sup> Porcentagem total de plantas positivas por cultura.

<sup>2</sup> Valores entre parênteses representam intervalo de variação (mínimo-máximo) do logaritmo de UFC / g de tecido amostrado.

<sup>3</sup> As posições dos pontos estão relacionadas ao ponto de inoculação.

<sup>4</sup> Pecíolo e nervura principal da primeira folha acima do ponto de inoculação foram processados conjuntamente.

<sup>5</sup> Inoculação em caule de mudas com suspensão 10<sup>6</sup> UFC/ml.

<sup>6</sup> Inoculação em caule de mudas com suspensão 10<sup>8</sup> UFC/ml.

<sup>7</sup> Inoculação em pecíolo de folhas com suspensão 10<sup>8</sup> UFC/ml.

- Não se aplica (tecido não amostrado).

*fastidiosa* foi demonstrada pela sua detecção em pecíolos após inoculação em ramos, e em ramos após inoculação em pecíolos; o que ocorreu de 1 a 2 semanas após início da colonização do hospedeiro. Apesar do número de pontos amostrados positivos ter aumentado com o tempo, a porcentagem total de plantas infectadas permaneceu relativamente constante nos três ensaios nos períodos avaliados; demonstrando rápida colonização dos tecidos do xilema pelo patógeno. O movimento de *X. fastidiosa* no sentido inverso ao da seiva no xilema foi detectado 1 semana após a inoculação, no ensaio B, ao isolar-se a bactéria do caule, 4 cm abaixo da área de inoculação (Tabela 3).

A redução observada após 16 semanas na porcentagem de amostras positivas no caule para o ensaio A (Tabela 3), deveu-se, provavelmente, ao aumento no diâmetro do caule. Devido à limitação no peso de tecido a ser processado, reduziu-se o comprimento do segmento de caule amostrado. Possivelmente, isto resultou em aumento relativo no volume de outros tecidos vegetais em relação a vasos de xilema no segmento amostrado. A manutenção da porcentagem total de plantas infectadas em níveis semelhantes aos de períodos anteriores sustenta esta hipótese.

A população de *X. fastidiosa* detectada nas plantas foi de  $10^4$  UFC/g na primeira semana após a inoculação, aumentando na quarta semana para  $10^4$ – $10^6$  UFC/g, e mantendo-se neste nível até o término das avaliações (16 semanas) com pequenas variações (Figuras 1, 2 e 3). Para alguns pontos de amostragem não foram apresentadas estimativas de população bacteriana, em certos períodos de avaliação, devido à ausência de amostras positivas (Tabela 3). Populações de apenas  $10^2$ – $10^3$  UFC/g foram detectadas, indicando boa sensibilidade do método de detecção.

Folhas assintomáticas coletadas 30 cm acima do ponto de inoculação, após 16 semanas. No ensaio A, tiveram 33 % de infecção de *X. fastidiosa*, sendo a população detectada entre  $10^4$ – $10^6$  UFC/g. No ensaio B, 31,3 % das folhas assintomáticas amostradas 15 cm acima da área de inoculação, após o mesmo período, foram positivas e apresentaram população de  $10^2$ – $10^6$  UFC/g. Já quando *X. fastidiosa* foi inoculada em folhas (ensaio C), nenhuma folha 15 cm acima do ponto de inoculação foi positiva após 16 semanas.

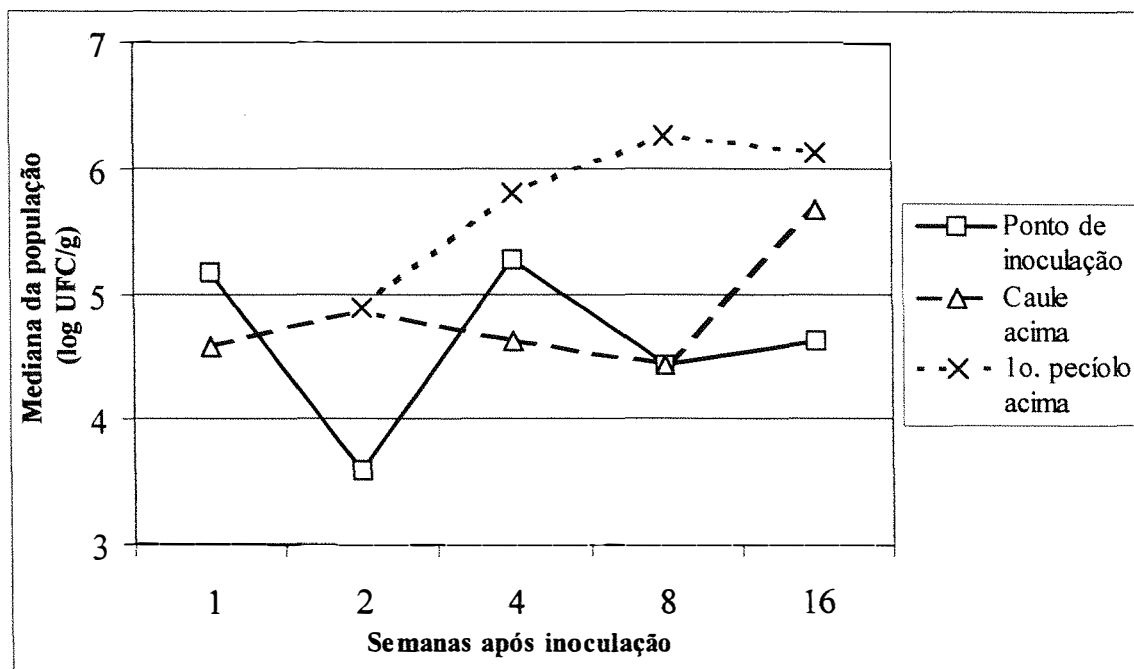


Figura 1. Mediana da população de *Xylella fastidiosa*, em três pontos da planta, em períodos sucessivos após inoculação mecânica de suspensão bacteriana com  $10^6$  unidades formadoras de colônias (UFC)/ml em caule de mudas de *Citrus sinensis*, no ensaio A. Piracicaba, dezembro/98 a março/99.

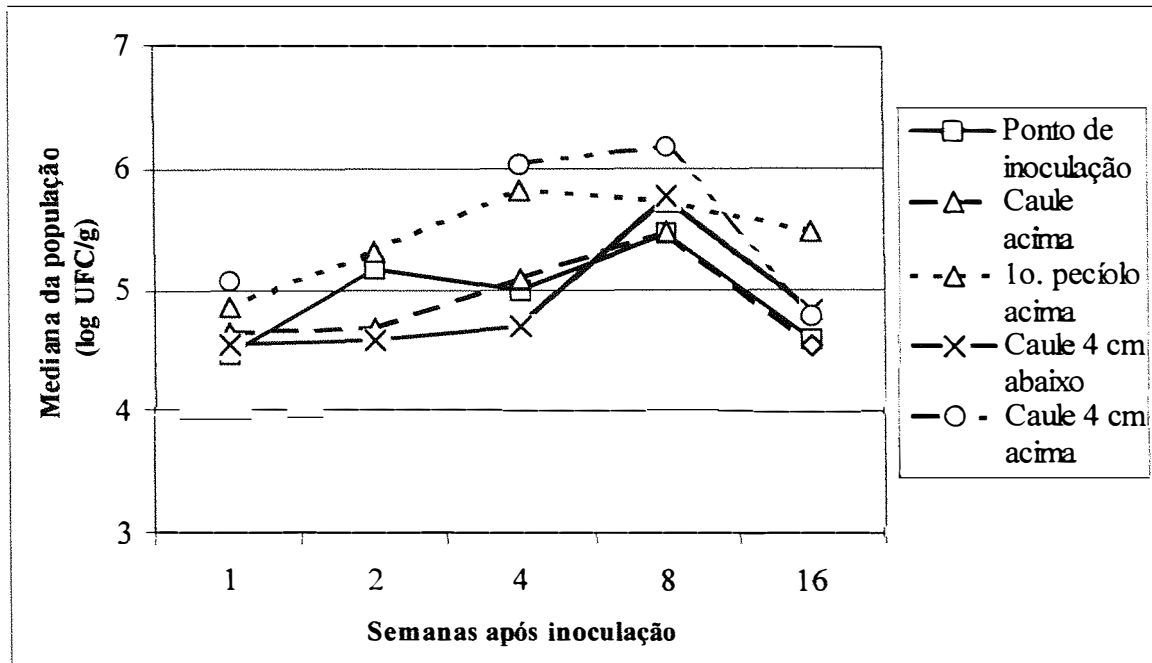


Figura 2. Mediana da população de *Xylella fastidiosa*, em cinco pontos da planta, em períodos sucessivos após inoculação mecânica de suspensão bacteriana com  $10^8$  unidades formadoras de colônias (UFC)/ml em caule de mudas de *Citrus sinensis*, no ensaio A. Piracicaba, janeiro/98 a abril/99.

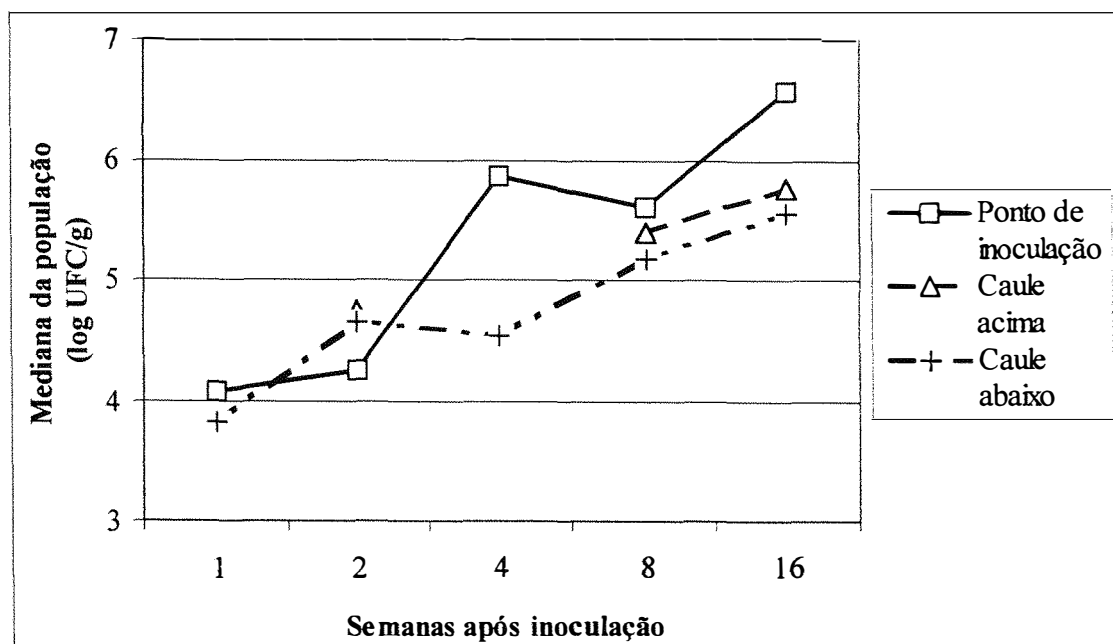


Figura 3. Mediana da população de *Xylella fastidiosa*, em três pontos da planta, em períodos sucessivos após inoculação mecânica de suspensão bacteriana com  $10^8$  unidades formadoras de colônias (UFC)/ml em pecíolo foliar de mudas de *Citrus sinensis*, no ensaio A. Piracicaba, janeiro/98 a abril/99.

Todas as folhas sintomáticas avaliadas em A, após 16 semanas, foram positivas por cultura, com  $10^5$ – $10^6$  UFC/g. Além disso, todas as plantas sintomáticas tiveram amostras positivas, enquanto que as assintomáticas foram todas negativas. O mesmo não ocorreu no ensaios B e C, nos quais algumas plantas assintomáticas foram positivas por cultura. Talvez, a redução da temperatura com o término do outono tenha reduzido a expressão de sintomas nas plantas infectadas, já que os ensaios B e C foram instalados mais tardiamente que o A. Laranjeira (1997) demonstrou que no final do outono ocorre redução de sintomas em plantas infectadas no campo.

Nos três ensaios, os sintomas da CVC (áreas amarelas circulares na face adaxial de folhas e eventualmente pústula marrom na abaxial) surgiram 2 meses após a inoculação. No geral, folhas imediatamente acima do ponto de inoculação foram as primeiras a tornarem-se sintomáticas; mas folhas abaixo desse ponto também foram observadas com sintomas. As folhas sintomáticas mais distantes foram a sétima acima e a quarta abaixo do ponto de inoculação. O número de folhas sintomáticas variou de 1 a 7 por planta, com média de 2 por planta; a maioria dos sintomas surgiu 2 a 3 meses após a inoculação.

## 5 DISCUSSÃO

Os resultados obtidos demonstram a eficiência do método de isolamento primário de *Xylella fastidiosa* descrito por Hill & Purcell (1995a) para plantas cítricas infectadas com a bactéria. Infelizmente, não existem relatos da eficiência de isolamento de *X. fastidiosa* de citros para os vários métodos de extração da bactéria existentes, impossibilitando comparação com o utilizado nesta pesquisa.

A uniformidade na extração de células do patógeno, do interior dos vasos de xilema entre várias amostras, é um fator vital para que se possa avaliar a população da bactéria entre tratamentos. Os métodos previamente testados para citros baseiam-se na deposição de gotas de seiva de xilema de ramos cítricos, comprimindo-se uma ponta estéril de folha infectada sobre o meio de cultura (Hartung et al., 1994) ou picando-se a amostra e transferindo-a para tampão ou meio de cultura líquido, com agitação do material e plaqueamento do sobrenadante em meio sólido (Lee et al., 1993). Entretanto, nenhum destes métodos gera estimativas do número de células infectando a amostra.

A trituração do material vegetal em homogeneizador mecânico, promove ruptura dos vasos de xilema de forma uniforme em todas as amostras processadas, permitindo a liberação de células de *X. fastidiosa* na suspensão resultante. Através do plaqueamento de alíquotas da suspensão, é possível estimar-se a quantidade de células presentes na amostra, através de contagem do número de unidades formadoras de colônias (UFC). Quando comparado com outros métodos para quantificação de *X. fastidiosa* em videira, este método foi cerca de 10 a 100 vezes mais eficiente na liberação de células do tecido vegetal na suspensão a ser plaqueada em meio de cultura (Hopkins 1985; Fry & Milholland, 1990 e Hill & Purcell, 1995b). Devido a observação de baixas

populações de *X. fastidiosa* em tecidos sintomáticos de citros, a eficiência de extração da bactéria é um fator limitante para isolamento do patógeno em meio de cultura. Métodos que limitam o fracionamento do tecido amostrado, reduzem drasticamente a probabilidade de liberação de células, dificultando seu isolamento.

Contaminantes presentes durante o isolamento de *X. fastidiosa*, provavelmente microrganismos endofíticos, foram eliminados através de diluições de suspensões homogeneizadas. Diluições de 10 vezes foram suficientes para reduzir a incidência de contaminantes. Com diluições de 100 vezes, ocorre eliminação total dos contaminantes e o método ainda mantém-se adequado para isolamento da bactéria, uma vez que a população bacteriana variou de  $10^5$ – $10^6$  UFC/g em folhas cítricas sintomáticas. Assim, o plaqueamento de suspensões homogeneizadas diluídas pode aumentar a eficiência de isolamento e reduzir gastos com reagentes e outros itens, uma vez que eliminar-se-ão as perdas devido a contaminantes. Uma redução de apenas 10 vezes na capacidade de detecção pode não ser significativa em estudos epidemiológicos e outros; entretanto, pode ser necessário detectar a bactéria em baixas populações em pesquisas com materiais avirulentos ou geneticamente modificados.

Vários meios específicos tem sido usados para isolamento de *X. fastidiosa* de citros, entre eles PW (Davis et al., 1981a), BCYE (Leite Jr. & Leite, 1991), PWH (Lee et al., 1993) e SPW (Hartung et al., 1994). Porém, poucas informações foram coletadas relacionadas ao isolamento primário do patógeno. Nesta pesquisa, o meio PWG (Hill & Purcell, 1995a) foi testado para a estirpe de citros, mostrando características de isolamento semelhantes ao PW, apesar de ter sido mais eficiente com relação ao número médio de colônias produzidas. Já o meio BCYE foi inferior em todos os parâmetros avaliados, sendo cerca de 70 % menos eficiente que PWG para isolamento de folhas sintomáticas. A baixa eficiência de isolamento, aliada à população de *X. fastidiosa* observada em citros, podem reduzir as chances de detecção do patógeno pelo meio BCYE, sendo este, portanto, menos recomendado para a quantificação populacional da estirpe da CVC. Além disso, o surgimento de colônias em BCYE ocorreu após 14 dias,



enquanto que no PWG e PW levou apenas 7 dias; esta diferença deve ser considerada, principalmente quando se deseja processar um número elevado de amostras.

Apesar da aparente superioridade do meio PWG em relação ao PW, deve-se considerar que o diâmetro médio de colônias foi semelhante em dois dos três ensaios realizados; além disso, o período de incubação das colônias foi igual. Assim, para identificação do meio com melhores resultados no isolamento primário, um maior número de isolados deve ser testado. Porém, um estudo neste sentido pode ser pouco relevante, uma vez que diferentes estirpes de *X. fastidiosa* podem possuir diferentes necessidades nutricionais, o mesmo podendo ocorrer entre isolados da estirpe de citros.

A presença de inibidores do crescimento de *X. fastidiosa* em suspensões da bactéria, oriundos da maceração do tecido vegetal de hospedeiros, pode reduzir totalmente o desenvolvimento de colônias da bactéria em meio de cultura sólido (Purcell & Saunders, 1999). Esta pesquisa mostrou que a homogeneização de macerados suspensão de *X. fastidiosa* com tecido cítrico não inibiu o crescimento bacteriano, mas sim estimulou a formação de um maior número de colônias em meio PWG, em relação a suspensões bacterianas sem adição do tecido vegetal. É possível que compostos presentes no tecido cítrico tenham favorecido a formação de colônias. Hartung et al. (1994) observaram que componentes de citros estimularam o crescimento de *X. fastidiosa*, desenvolvendo o meio SPW baseado nestas observações. Entretanto, as colônias levaram mais tempo para surgirem no SPW em seu experimento do que foi observado para o PW e PWG no presente estudo.

A grande quantidade de fimbrias observadas em células de *X. fastidiosa* em vasos de xilema de citros (Chagas et al., 1992), pode também ocorrer em suspensão de células, favorecendo a agregação das mesmas. Esta agregação pode ocorrer aleatoriamente, reduzindo o número final de UFC, pois tanto uma célula como um agregado de células formarão uma única UFC. Talvez o tampão PBS degrade as células em suspensão; entretanto, este fator é de difícil análise quando considerarmos que, através do tempo, aumentam também as chances de formação de agregados. Por não ter sido possível determinar qual o fator responsável para maior recuperação de UFC em

suspensões nas quais foi adicionado tecido cítrico, as hipóteses sugeridas devem ser pesquisadas para melhor conhecimento dos eventos a que as células estão sujeitas quando em suspensão. Por outro lado, o teste demonstrou não haverem inibidores do crescimento de *X. fastidiosa* por macerados de citros, fortalecendo os resultados de quantificação obtidos pelo método usado nessa pesquisa.

Ainda não existe um método eficiente e prático para detecção de bactéria no estomodéu das cigarrinhas vetoras de *X. fastidiosa* em citros. Entretanto, para PD vários métodos de detecção têm sido usados com sucesso, tais como microscopia eletrônica (Purcell et al., 1979), PCR com imunocaptura (Pooler & Hartung, 1995), bioensaios de transmissão (Purcell & Finlay, 1979) e isolamento em meio de cultura (Hill & Purcell, 1995a). A obtenção de amostras positivas de cigarrinhas por cultura e ELISA nesta pesquisa demonstram potencial para aprimoramento destas técnicas para vetores em citros.

A não detecção de *X. fastidiosa* em 43 indivíduos das espécies *Dilobopterus costalimai* e *Bucephalogonia xanthophis* após a alimentação prolongada em plantas fonte, pode significar baixa eficiência de aquisição da bactéria em citros, ou ainda baixa sensibilidade de detecção dos métodos utilizados. Em videira, após um período de acesso à aquisição (PAA) de 48 horas, uma eficiência de aquisição superior a 90 % é esperada (Purcell & Finlay, 1979). Entretanto, verificou-se que a eficiência de transmissão da estirpe de videira é reduzida drasticamente quando a aquisição ocorre em plantas com baixo título da bactéria (Hill & Purcell, 1997). A baixa população de *X. fastidiosa* observada em citros ( $10^4$ - $10^6$  UFC/g) em relação à existente em videira ( $10^7$ - $10^9$  UFC/g) (Hill & Purcell, 1995b), pode ser um fator determinando a baixa eficiência de aquisição em citros (Hill & Purcell, 1997).

O baixo número de insetos infectivos obtidos no ensaio de inoculação, mesmo com indivíduos coletados no campo (que poderiam estar previamente infectivos), também demonstra baixa eficiência de aquisição do patógeno. Além disso, a não transmissão pelos poucos indivíduos (n=20) infectivos neste ensaio, sugere uma baixa eficiência de inoculação da estirpe de citros pelos vetores. É possível que a avaliação da plantas

inoculadas com apenas 2-3 meses da inoculação tenha sido precoce, uma vez que plantas inoculadas por insetos demoram pelo menos 5 meses para mostrarem sintomas (Lopes et al., 1996). Possivelmente isto ocorra devido à pequena quantidade de células inoculadas por insetos Hill & Purcell (1995a) demonstraram que menos de 100 células presentes no inseto são suficientes para que uma inoculação seja realizada. Assim, é possível que a velocidade de colonização do hospedeiro após inoculação por vetores seja menor do que a observada em inoculação mecânica, na qual altas quantidades do patógeno são introduzidas no hospedeiro.

O reduzido diâmetro das colônias isoladas das cabeças de cigarrinhas positivas no estudo de eficiência de inoculação (item 4.4), pode ser devido a inibidores liberados durante à maceração da cabeça do inseto ou ainda pelo isolamento de uma outra estirpe de *X. fastidiosa*, que já estaria presente nas cigarrinhas trazidas do campo. A manutenção do pequeno diâmetro dessas colônias, mesmo após repicagens em cultura, fortalecem a hipótese de que seja uma característica da estirpe. Porém, sob determinadas condições, as bactérias podem ativar genes que codificam proteínas para melhor sobrevivência no ambiente Potera (1996), talvez isto tenha ocorrido com *X. fastidiosa* no estilete de vetores.

A suposta eficiência de aquisição, considerando-se que os insetos eram sadios antes do PAA, foi de 9,7 e 2,5 % para *Oncometopia facialis* e *Dilobopterus costalimai*, respectivamente. Estes valores são mais altos que os de eficiência de transmissão obtidos por Krügner et al. (1998) para *O. facialis* (1,3 %); porém, na presente pesquisa o PAA foi duas vezes mais longo (96 horas), aumentando a probabilidade de aquisição. Além disso, Krügner et al.<sup>1</sup> observaram infectividade natural de apenas 0,2 % para *O. facialis*, valor muito inferior ao observado no presente estudo (9,7 %). Portanto, é provável que a maioria dos indivíduos de *O. facialis* tenham adquirido a bactéria durante o PAA planta-fonte no ensaio de eficiência de inoculação (item 3.7), reduzindo assim a probabilidade das colônias de pequeno diâmetro, isoladas das cigarrinhas, serem de outra estirpe.

A população bacteriana na planta hospedeira está diretamente relacionada à eficiência de transmissão de *X. fastidiosa* por vetores, no caso de PD (Hill & Purcell,

---

<sup>1</sup> KRÜGNER, R.; LOPES, M.T.C.V.; LOPES, J.R.S. (ESALQ/USP). Comunicação pessoal, 1999.

1997). Para uma população bacteriana de  $10^6$  UFC/g, estes autores verificaram uma eficiência de transmissão ao redor de 40 %, sendo que a população mínima necessária para transmissão em videira foi estimada em  $10^4$  UFC/g. Na presente pesquisa, a população de *X. fastidiosa* observada nas plantas-fonte de citros variou de  $10^4$  a  $10^6$  UFC/g. Portanto, a aquisição pode ser uma etapa pouco eficiente na transmissão de *X. fastidiosa* em citros. Deve-se considerar que plantas-fonte são geralmente organismos severamente debilitados pelo patógeno, sendo também possível uma redução na população bacteriana devido à limitação de nutrientes nestas plantas.

A baixa capacidade de aquisição do patógeno em citros pode explicar a baixa eficiência de transmissão por cigarrinhas (Krügner et al., 1998). Epidemiologicamente, esta informação tem influência direta na disseminação da doença, uma vez que as interações inseto-planta-patógeno ocorrem na forma de ciclos durante o ano. A análise destas relações pode gerar informações para melhoria das técnicas de controle atualmente utilizadas (Carlos et al., 1997 e Gravena et al., 1997).

Purcell (1977) demonstrou que a estirpe de videira é sensível a baixas temperaturas. Portanto, é possível que ocorra flutuação da população de *X. fastidiosa* em citros durante o ano, como ocorre com videira (Hopkins, 1981). Se folhas sintomáticas, possuem população máxima de  $10^6$  UFC/g durante o verão, pode ocorrer redução desta população em épocas mais frias do ano, reduzindo ainda mais a probabilidade de aquisição da bactéria pelas cigarrinhas. Altas populações dos vetores ocorrem no verão e outono (Yamamoto, 1998), em meses de alta temperatura. Talvez nesta mesma época a população de *X. fastidiosa* em citros também seja mais alta, favorecendo a aquisição por cigarrinhas.

Atualmente, a poda de ramos infectados e aplicação de inseticidas para controle dos vetores são as práticas para convívio com a CVC, quando a doença está presente no pomar (Carlos et al., 1997). A poda é uma medida que tem sido eficiente, por eliminar o inóculo do planta, impedindo o avanço sistêmico da infecção e reduzindo a probabilidade de aquisição por cigarrinhas. Entretanto, o controle dos vetores não deve ser realizado de forma indiscriminada, pois pode afetar o manejo integrado de pragas em citros (Gravena

et al., 1997). O conjunto das informações relativas à transmissão da bactéria, pode levar a um manejo das cigarrinhas com menor impacto ambiental. Se a população bacteriana for reduzida em citros durante os meses mais frios, talvez o controle dos vetores nesta época seja desnecessário. Além disso, num sistema em que a frequência de transmissão é baixa, o controle químico torna-se mais eficiente, já que eliminando-se a maior parte da população de insetos restarão poucos indivíduos infectivos.

A inoculação artificial de *X. fastidiosa* em citros, assim como outros fitopatógenos em seus respectivos hospedeiros, é essencial para desenvolvimento de variedades resistentes, teste de patogenicidade e outras pesquisas a serem consideradas. A utilização de insetos vetores para inoculação da bactéria em citros deve ser descartada para a maioria dos estudos não relacionados à por tratar-se de um método ineficiente.

O método desenvolvido por Hopkins (1985), baseado na perfuração de ramos e pecíolos do hospedeiro, com absorção da suspensão bacteriana pela planta; é rápido, prático, e possibilita inoculação em tecidos mais jovens, nos quais os vetores preferem se alimentar (Yamamoto & Roberto, 1996). A alta eficiência de inoculação obtida com o método expressa seu potencial para inúmeras pesquisas. A possibilidade de inocular-se, por exemplo, elevado número de isolados naturais e mutantes, em diferentes variedades de laranja doce, demonstra a aptidão da metodologia para várias áreas de estudo da CVC. A rápida expressão de sintomas em plantas inoculadas pelo método (2-3 meses), pode significar uma redução no tempo em estudos de patogenicidade de isolados, assim como de resistência de variedades e estudos correlatos.

Por ser um patógeno endofítico, o desenvolvimento de sua infecção deve ser analisado por parâmetros indiretos, como sua multiplicação e movimentação no hospedeiro. Uma alternativa direta, ainda não disponível, seria observações microscópicas de isolados mutantes, nos quais genes de marcação seriam inseridos, como realizado com *Ralstonia solanacearum* (Etchebar et al., 1998).

A colonização de citros por *X. fastidiosa* foi rápida; entretanto, as populações observadas mantiveram-se baixas ( $< 10^6$  UFC/g), mesmo após o surgimento de sintomas foliares. Em videira, a população bacteriana aumenta durante a colonização, iniciando em

$10^6$  UFC/g com 1 semana após a inoculação e atingindo  $10^9$  UFC/g após 4 semanas (Hill & Purcell, 1995b). Apesar da diferença na quantidade de células detectáveis, ambas as estirpes são patogênicas, sugerindo que talvez a quantidade de células vivas presentes no hospedeiro não seja o mecanismo direto de virulência para *X. fastidiosa* em citros.

Os vasos de xilema possuem membranas em suas terminações, as quais permitem o fluxo de seiva mas impedem o transporte de partículas, como bactérias, devido ao pequeno diâmetro dos poros das membranas. Obviamente, para tornar-se sistêmica no hospedeiro, a bactéria precisa superar esta barreira; entretanto, este mecanismo ainda não foi descrito. Fry et al. (1994) identificaram várias enzimas produzidas por *X. fastidiosa* em meio de cultura, entretanto nenhuma delas poderia degradar as membranas do xilema. Davis et al. (1981a) discutiram a possibilidade de que a matriz envolvendo a bactéria no xilema, poderia concentrar enzimas em quantidade suficiente para ruptura do tecido vegetal, permitindo o movimento sistêmico da infecção. Porém, não existem evidências que suportem esta hipótese. Além disso, a planta possui suas defesas, como tiloses e outros compostos. Uma vez detectado um organismo estranho numa célula de xilema, a planta tende a isolá-la, fechando suas conexões com o sistema vascular. Isto é possível, pois uma vez que o complexo de feixes vasculares atua sempre com capacidade de vasos maior que a necessária (Pearce, 1996).

A rápida movimentação do patógeno observada em mudas cítricas em casa de vegetação, pode não ser verificada no campo, onde a fisiologia da planta, assim como as características edafo-climáticas são diferentes. Considerando-se que a poda utilizada por produtores tem sido eficiente no controle da doença (Carlos et al., 1997), é provável que o movimento da bactéria seja mais lento em árvores no campo. Assim, sugere-se que a metodologia de quantificação bacteriana adaptada nessa pesquisa seja utilizada para avaliar o movimento sistêmico de *X. fastidiosa* em pomares comerciais.

## 6 CONCLUSÕES

- A metodologia descrita por Hill & Purcell (1995a) é eficiente para isolamento e quantificação de *Xylella fastidiosa* de citros.
- Os meios sólidos específicos PWG e PW são mais eficientes para isolamento primário e promovem crescimento mais rápido de *X. fastidiosa* de citros que o BCYE, sendo portanto mais apropriados para a técnica de quantificação da bactéria.
- Tecidos cítricos homogeneizados, caule, pecíolo e nervura central de folhas, promovem maior recuperação de UFC em meio sólido que suspensões puras de *X. fastidiosa*.
- A inoculação mecânica de suspensão de *X. fastidiosa*, através de perfurações com alfinete entomológico no caule e em folhas, é eficiente para iniciar infecções em mudas cítricas, induzindo sintomas foliares 2 meses após a inoculação.
- Maior concentração de *X. fastidiosa* na suspensão inoculada promove maior eficiência de inoculação em mudas cítricas.
- *X. fastidiosa* é sistêmica em mudas cítricas, sendo isolada do caule em pontos 4 cm acima e 4 cm abaixo do ponto de inoculação, bem como da primeira folha acima desse ponto, com 1 semana após sua inoculação.

- Não ocorre queda na porcentagem de plantas com infecção sistêmica no período entre 1 e 16 semanas após a inoculação.
- A população da bactéria em mudas cítricas infectadas varia de  $10^3$  a  $10^6$  UFC/g de tecido, no período de até 4 meses após a inoculação. A população tende a aumentar até 4 semanas da inoculação, estabilizando-se no período subsequente.
- Folhas com sintomas de clorose variegada dos citros apresentam população média de  $10^5$  UFC/g de tecido
- A aquisição e inoculação de *X. fastidiosa* em citros por cigarrinhas vetoras são processos ineficientes.



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA, R.P.P.; LOPES, J.R.S. Desenvolvimento de imaturos de *Dilobopterus costalimai* Young, *Oncometopia facialis* (Signoret) e *Homalodisca ignorata* Melichar (Hemiptera: Cicadellidae) em citros. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v. 28, p.179-182, 1999.
- AMARO, A. A.; MAIA, M.L.; GONZALEZ, M.A. Efeitos econômicos decorrentes da clorose variegada dos citros. In: Donadio, L.C.; Moreira, C.S. (Ed.). **Clorose variegada dos citros**. Bebedouro: 1997. p.123-135.
- ARAUD-RAZOU, I.; VASSE, J.; MONTROZIER, H.; ETCHEBAR, C.; TRIGALET, A. Detection and visualization of the major acidic exopolysaccharide of *Ralstonia solanacearum* and its role in tomato root infection and vascular colonization. **European Journal of Plant Pathology**, v.104, p.795-809, 1998.
- BERETTA, M.J.G.; BARTHE, G.A.; CECCARDI, T.L.; LEE, R.F.; DERRICK, K.S. A survey of strains of *Xylella fastidiosa* in citrus affected by citrus variegated chlorosis and citrus blight in Brazil. **Plant Disease**, v.81, p.1196-1198, 1997.
- BERISHA, B.; CHEN, Y.D.; ZHANG, G.Y.; XU, B.Y.; CHEN, T.A. Isolation of Pierce's disease bacteria from grapevines in Europe. **European Journal of Plant Pathology**, v.104, p.427-433, 1998.

- BONALUMÉ, R. Brazil to sequence 'first plant pathogen'. **Nature**, v.389, p.654, 1997.
- BRLANSKY, R.H.; TIMMER, L.W.; FRENCH, W.J.; McCOY, R.E. Colonization of the sharpshooter vectors, *Oncometopia nigricans* and *Homalodisca coagulata*, by xylem-limited bacteria. **Phytopathology**, v.73, p.530-535, 1983.
- CARLOS, E.F.; CABRITA, J.R.M.; RODAS, V.Z.; GARCIA JÚNIOR, A.; AYRES, A.J. Uso da poda em pomares com C.V.C. In: Donadio, L.C.; Moreira, C.S. (Ed.). **Clorose variegada dos citros**. Bebedouro: 1997. p.113-122.
- CHAGAS, C.M.; ROSSETTI, V.; BERETTA, M.J.G. Electron microscopy studies of a xylem-limited bacterium in sweet orange affected with citrus variegated chlorosis disease in Brazil. **Journal of Phytopathology**, v.134, p.306-312, 1992.
- CHANG, C.J.; DONALDSON, R.C. *Xylella fastidiosa*: cultivation in chemically defined medium. **Phytopathology**, v.83, p.192-194, 1993.
- CHANG, C.J.; GARNIER, M.; ZREIK, L.; ROSSETTI, V.; BOVÉ, J.M. Culture and serological detection of the xylem-limited bacterium causing citrus variegated chlorosis and its identification as a strain of *Xylella fastidiosa*. **Current Microbiology**, v.27, p.137-142, 1993.
- CHANG, C.J.; ROBACKER, C.D.; LANE, R.P. Further evidence for the isolation of *Xylella fastidiosa* on nutrient agar from grapevines showing Pierce's disease symptoms. **Canadian Journal of Plant Pathology**, v.12, p.405-408, 1990.
- CHANG, C.J.; WALKER, J.T. Bacterial leaf scorch of northern red oak: isolation, cultivation and pathogenicity of a xylem-limited bacteria. **Plant Disease**, v.72, p.730-733, 1988.

- DALY, H.V.; DOYEN, J.T.; PURCELL, A.H. **Introduction to insect biology and diversity**. Segunda edição. Oxford University Press, 1998. 680p.
- DAVIS, M. J.; FRENCH, W.J.; SCHAAD, N.W. Axenic culture of the bacteria associated with phony disease of peach and plum leaf scald. **Current Microbiology**, v.6, p.309-314, 1981a.
- DAVIS, M.J.; PURCELL, A.H.; THOMSON, S.V. Pierce's disease of grapevine: isolation of the causal bacterium. **Science**, v.199, p.75-77, 1978.
- DAVIS, M.J.; PURCELL, A.H.; THOMSON, S.V. Isolation media for the Pierce's disease bacterium. **Phytopathology**, v.70, p.425-429, 1980.
- DAVIS, M.J.; WHITCOMB, R.F.; GILLASPIE Jr., A.G. Fastidious bacteria of plant vascular tissue and invertebrates (including so-called rickettsia-like bacteria). In: Starr, M.p.; Stolp, H.; Trüper, H.G.; Balows, A.; Schlegel, H.G. (Ed.). **The prokaryotes. A handbook on habitats, isolation and identification of bacteria**. USA, 1981b. p.2172-2188.
- DAY, M.F.; IRZYKIEWICZ, H.; MCKINNON, A. Observations on the feeding of the virus vector *Orosius argentatus* (Evans), and comparisons with certain other jassids. **Australian Journal of Scientific Research, Series B, Biological Sciences**, v.5, p.128-142, 1952.
- ETCHEBAR, C.; TRIGALET-DEMERY, D.; van GIJSEGEM, F.; VASSE, J.; TRIGALET, A. Xylem colonization by an HrcV<sup>-</sup> mutant of *Ralstonia solanacearum* is a key factor for the efficient biological control of tomato bacterial wilt. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v.11, p.869-877, 1998.

- FLETCHER, J.; WAYADANDE, A.; MELCHER, U.; YE, F. The phytopathogenic mollicute-insect vector interface: a closer look. **Phytopathology**, v.88, p.1351-1358, 1998.
- FRY, S.M.; HUANG, J.S.; MILHOLLAND, R.D. Isolation and preliminary characterization of extracellular proteases produced by strains of *Xylella fastidiosa* from grapevines. **Phytopathology**, v. 84, p.357-363, 1994.
- FRY, S.M.; MILHOLLAND, R.D. Multiplication and translocation of *Xylella fastidiosa* in petioles and stems of grapevine resistant, tolerant, and susceptible to Pierce's disease. **Phytopathology**, v.80, p.61-65, 1990.
- GRAVENA, S.; DeNEGRI, J.D.; QUAGGIO, J.A.; GONZALEZ, M.A.; PINTO, W.B.S.; BASILE, G.B. Manejo de cigarrinhas e CVC no pomar. In: Donadio, L.C.; Moreira, C.S. (Ed.). **Clorose variegada dos citros**. Bebedouro: 1997. p.93-112.
- HARTUNG, J.S.; BERETTA, J.; BRLANSKY, R.H.; SPISSO, J.; LEE, R.F. Citrus variegated chlorosis bacterium: axenic culture, pathogenicity, and serological relationships with other strains of *Xylella fastidiosa*. **Phytopathology**, v.84, p.591-597, 1994.
- HILL, B.L.; PURCELL, A.H. Acquisition and retention of *Xylella fastidiosa* by an efficient vector, *Graphocephala atropunctata*. **Phytopathology**, v.85, p.209-213, 1995a.
- HILL, B.L.; PURCELL, A.H. Multiplication and movement of *Xylella fastidiosa* within grapevine and four other plants. **Phytopathology**, v.85, p.1368-1372, 1995b.

- HILL, B.L.; PURCELL A.H. Populations of *Xylella fastidiosa* in plants required for transmission by an efficient vector. **Phytopathology**, v.87, p.1197-1201, 1997.
- HOPKINS, D.L. Seasonal concentration of the Pierce's disease bacterium in grapevine stems, petioles, and leaf veins. **Phytopathology**, v.71, p.415-418, 1981.
- HOPKINS, D.L. Physiological and pathological characteristics of virulent and avirulent strains of the bacterium that causes Pierce's disease of grapevine. **Phytopathology**. v.75, p.713-717, 1985.
- HOPKINS, D.L. *Xylella fastidiosa*: xylem-limited bacterial pathogen of plants. **Annual Review of Phytopathology**, v.27, p.271-290, 1989.
- HOPKINS, D.L.; MOLLENHAUER, H.H. Rickettsia-like bacterium associated with Pierce's disease of grapes. **Science**, v. 179, p.298-300, 1973.
- HOPKINS, D.L.; MORTENSEN, J.A. Suppression of Pierce's disease symptoms by tetracycline antibiotics. **Plant Disease Reporter**, v. 55, p. 610-612, 1971.
- KRÜGNER, R.; LOPES, M.T.V. de C.; SANTOS, J.S.; BERETTA, M.J.G.; LOPES, J.R.S.. Transmission efficiency of *Xylella fastidiosa* by sharpshooters and identification of two new vector species. In: CONFERENCE OF THE INTERNATIONAL ORGANIZATION OF CITRUS VIROLOGISTS, 14, Brasil,1998. **Programme & Abstracts**. 1998. p.81.
- LARANJEIRA, F.F. Dinâmica espacial e temporal da clorose variegada dos citros. Piracicaba, 1997. 144p. Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.

- LARANJEIRA, F.F.; BERGAMIN FILHO, A.; AMORIM, L. Dinâmica e estrutura de focos da clorose variegada dos citros (CVC). **Fitopatologia Brasileira**, v.23, p.36-41, 1998.
- LARANJEIRA, F.F.; PALAZZO, D.A. Danos qualitativos à produção de laranja 'Natal' causados pela clorose variegada dos citros. **Laranja**, v.20, p.77-91, 1999.
- LEE, R.F.; BERETTA, M.J.G.; HARTUNG, J.H.; HOOKER, M.E.; DERRICK, K.S. Citrus variegated chlorosis: confirmation of *Xylella fastidiosa* as the causal agent. **Summa Phytopathologica**, v.19, p.123-125, 1993.
- LEITE JÚNIOR., R.P.; LEITE, R.M.V.B.C. Associação de *Xylella fastidiosa* com clorose variegada dos citros. **Summa Phytopathologica**, v.17, p.7, 1991. /Resumo/
- LEU, L.S.; SU, C.C. Isolation, cultivation and pathogenicity of *Xylella fastidiosa*, the causal bacterium of pear leaf scorch disease in Taiwan. **Plant Disease**, v.77, p.642-646, 1993.
- LI, W. Avaliação do comportamento de variedade de copas e porta-enxertos à clorose variegada dos citros. Jaboticabal, 1997. 103p. Tese (Doutorado) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista "Julio de Mesquita Filho.
- LOPES, J.R.S. Estudos com vetores de *Xylella fastidiosa* e implicações no manejo da clorose variegada dos citros. **Laranja**, v.20, p.329-344, 1999.
- 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. **Fitopatologia Brasileira** v.21, p.343, 1996. /Resumo/

- LOPES, J.R.S.; GIUSTOLIN, T.A.; MARUCCI, R.C.; TAKIMOTO, J.K.; MENDES, M.A. Composição de espécies de cigarrinhas (Hemiptera, Auchenorrhyncha) em café e citros na região de Bebedouro, SP. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA, 17, 1998, Rio de Janeiro. **Anais**. 1998. p.615.
- MALAVOLTA, E.; PRATES, H.S. **Informações agronômicas**: Situação atual do “amarelinho” ou “clorose variegada dos citros” na citricultura paulista. Piracicaba, Potafos, 1994. n° 65.
- MINSAVAGE, G.V.; THOMPSON, C.M.; HOPKINS, D.L.; LEITE, R.M.V.B.C.; STALL, R.E. Development of a polymerase chain reaction of *Xylella fastidiosa* in plant tissue. **Phytopathology**, v.84, p.456-461, 1994.
- MOYA-RAYGOZA, G.; NAULT, L.R. Transmission biology of maize bushy stunt phytoplasma by the corn leafhopper (Homoptera: Cicadellidae). **Annals of the Entomological Society of America**, v.91, p.668-676, 1998.
- NAULT, L.R. Arthropod transmission of plant viruses: a new synthesis. **Annals of the Entomological Society of America**, v.90, p.521-541, 1997.
- NEVES, E.M. O mundo citrícola em discussão. **Gazeta Mercantil / Planalto Paulista**, São Paulo, 10 jun. 1999. p.2.
- PEARCE, R.B. Antimicrobial defences in the wood of living trees. **New Phytologist**, v.132, p.203-233, 1996.
- PIERCE, N.B. The California vine disease. **United States Department of Agriculture Div. Veg. Path. Bull.**, v.2, p.1-222, 1892.

- POOLER, M.R.; HARTUNG, J.S. Genetic relationships among strains of *Xylella fastidiosa* from RAPD-PCR data. **Current Microbiology**, v.31, p.134-137, 1995.
- POTERA, C. Biofilms invade microbiology. **Science**, v.273, p.1795-1797, 1996.
- PRADO, E.; TJALLINGII, W.F. Aphid activities during sieve element punctures. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v.72, p.157-165, 1994.
- PURCELL, A.H. Spatial patterns of Pierce's disease in the Napa Valley. **American Journal of Enology and Viticulture**, v.25, p.162-167, 1974.
- PURCELL, A.H. Role of the blue-green sharpshooter, *Hordnia circellata*, in the epidemiology of Pierce's disease of grapevines. **Environmental Entomology**, v.4, p.745-752, 1975.
- PURCELL, A.H. Cold therapy of Pierce's disease of grapevines. **Plant Disease Reporter**, v.61, p.514-518, 1977.
- PURCELL, A.H. Leafhopper vectors of xylem-borne plant pathogens. In: Maramorosch, K.; Harris, K.F. **Leafhopper vectors and plant disease agents**. Nova York: Academic Press, 1979. p.603-625.
- PURCELL, A.H. Almond leaf scorch: leafhopper and spittlebug vectors. **Journal of Economic Entomology**, v.73, p.834-838, 1980.
- PURCELL, A.H. Vector preference and inoculation efficiency as components of resistance to Pierce's disease in European grape cultivars. **Phytopathology**, v.71, p.429-435, 1981.



PURCELL, A.H. *Xylella fastidiosa*, a regional problem or global threat?. **Journal of Plant Pathology**, v.79, p.99-105, 1997.

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

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

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

PURCELL, A.H.; SAUNDERS, S.R. Fate of Pierce's disease strains of *Xylella fastidiosa* in common riparian plants in California. **Plant Disease**, v.83, 1999. /No prelo/

RAVEN, J.A. Phytophages of xylem and phloem: a comparison of animal and plant sap-feeders. **Advances in Ecology Research**, v.13, p.135-234.

Replacing vegetation may remedy Pierce's disease. **California Agriculture**, v.51, p.6-7.

ROBERTO, S.R.. Flutuação populacional de cigarrinhas (Hemiptera: Cicadellidae) vetoras de *Xylella fastidiosa* em pomares de laranja doce no Estado de São Paulo. Jaboticabal, 1998. 106p. Tese (Doutorado) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista "Julio de Mesquita Filho.

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**, v.21, p.517-518, 1996.

ROSATO, Y.B.; NETO, J.R.; MIRANDA, V.S.; CARLOS, E.F.; MANFIO, G.P. Diversity of a *Xylella fastidiosa* population isolated from *Citrus sinensis* affected by citrus variegated chlorosis in Brazil. **Systematic and Applied Microbiology**, v.21, p.593-598, 1998.

ROSSETTI, V.; GARNIER, M.; BOVÉ, J.M.; BERETTA, M.J.G.; TEIXEIRA, A.R.R.; QUAGGIO, J.A.; DeNEGRI, J.D. Présence de bactéries dans le xylème d'orangers atteints de chlorose variégée une nouvelle maladie des agrumes au Brésil. **C. R. Acad. Sci. Paris**, v.310, p.345-349, 1990.

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

SHERALD, J.L. Pathogenicity of *Xylella fastidiosa* in american elm and failure of reciprocal transmission between strains from elm and sycamore. **Plant Disease**, v.77, p.190-193, 1993.

TAVELLA, L.; ARZONE, A. Comparative morphology of mouth parts of *Zyginidia pullula*, *Empoasca vitis*, and *Graphocephala fennahi* (Homoptera, Auchenorrhyncha). **Bollettino di Zoologia**, v.60, p.33-39, 1993.

UCHIBABA, E.Y.; LEITE Jr., R.P.; LEITE, R.M.V.B. Avaliação de meios de cultura gerais e específicos para cultivo de *Xylella fastidiosa* isolada de ameixeira com escaldadura da folha. **Fitopatologia Brasileira**, v.17, p.252-257, 1992

VAUTERIN, L.; HOSTE, B.; KERSTER, K.; SWINGS, J. Reclassification of *Xanthomonas*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.45, p.472-489.

YAMAMOTO, P.T. Espécies e flutuação populacional de cigarrinhas e psíldeos (Hemiptera) em pomares cítricos. Jaboticabal, 1998. 1123p. Tese (Doutorado) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista "Julio de Mesquita Filho.

YAMAMOTO, P.T. & ROBERTO, S.R. Aspectos relacionados às principais espécies de cicadélíneos (Hemiptera: Cicadellidae: Cicadellinae) que ocorrem em citros. In: CONGRESSO BRASILEIRA DE ENTOMOLOGIA, 16, Salvador, 1997. **Resumos**. 1997. p.237.

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

WELLS, J.M.; RAJU, B.C.; NYLAND, G.; LOWE, S.K. Medium for isolation and growth of bacteria associated with plum leaf scald and phony peach diseases. **Applied and Environmental Microbiology**, v.42, p.357-363, 1981.

WINKLER, A.J. (ed.); HEWITT, W.B.; FRAZIER, N.W.; FREITAG, J.H. Pierce's disease investigations. **Hilgardia**, v.19, p.207-264, 1949.