Universidade de São Paulo Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"

Papel de espécies de cigarrinhas (Hemiptera: Auchenorrhyncha) na disseminação de *Xylella fastidiosa* em oliveira na Serra da Mantiqueira

Joyce Adriana Froza

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

Piracicaba 2022

Joyce Adriana Froza Licenciatura Plena em Ciências Biológicas

Papel de espécies de cigarrinhas (Hemiptera: Auchenorrhyncha) na disseminação de *Xylella fastidiosa* em oliveira na Serra da Mantiqueira

Orientador Prof. Dr. JOÃO ROBERTO SPOTTI LOPES

Coorientador Prof. Dr. GABRIEL LUIZ FIGUEIRA MEJDALANI

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

Piracicaba 2022

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

Froza, Joyce Adriana

Papel de espécies de cigarrinhas (Hemiptera: Auchenorrhyncha) na disseminação de *Xylella fastidiosa* em oliveira na Serra da Mantiqueira / Joyce Adriana Froza. - - Piracicaba, 2022.

85 p.

Tese (Doutorado) - - USP / Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".

1. Olea europaea L. 2. Bactéria fitopatogênica 3. Taxonomia de Cicadellinae 4. Insetos vetores 5. Flutuação populacional I. Título

Dedicatória

Aos meus pais, Maria e Jair, por todo apoio, dedicação, incentivo e por acreditarem sempre em mim.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Dr. João Roberto Spotti Lopes, por toda a ajuda, amizade, confiança e incentivo, na produção dessa tese.

Ao meu coorientador Gabriel Mejdalani, pela amizade e pelos ensinamentos valiosos em taxonomia de Cicadellidae, que enriqueceu profundamente esta tese. Muito obrigada por sempre acreditar, pelos conselhos e incentivo para continuar na pesquisa.

A todos os professores e funcionários do Departamento de Entomologia e Acarologia da Esalq/USP.

A equipe do Laboratório de Insetos Vetores de Fitopatógenos, do qual faço parte, principalmente, àqueles que participaram dos experimentos e coletas, que foram essenciais para a conclusão desta tese.

A minha amiga e parceira de laboratório Mayerli Tatiana, que me auxiliou muito durante todo o doutorado, participando de muitas etapas. Sua ajuda foi essencial! Muito obrigada Tati!

A minha amiga e parceira de laboratório Mariana, por todas as conversas e aconselhamentos durante esse projeto.

A Dra. Edna da Apta, por acreditar na minha pesquisa e proporcionar oportunidades futuras.

A todos os produtores e funcionários das fazendas que disponibilizaram seu tempo e sua propriedade para o desenvolvimento desta tese, e que sempre nos receberam muitíssimo bem: Luiz Eugênico, Carina, Lorenzo, Carlos Diniz, Cristina, Marlene, Zetão, Dr. Homero, Márcia, Carlos David e Elke.

A todos os pesquisadores e funcionários do Campo Experimental de Maria da Fé da Epamig, principalmente, aos pesquisadores Luiz Fernando e Pedro, pela ajuda essencial e colaboração.

Aos amigos Pedro, Vanessa e Joaquim, da Epamig de Maria da Fé, por me receberem muito bem, me dando casa, comida e companhia durante todo o tempo que passei montando os experimentos de transmissão. Muitíssimo obrigada!

Ao meu namorido Rafael, por todo amor, carinho e dedicação por todo esse tempo. Por me ajudar em tudo, segurando as pontas em casa quando eu estava fora montando experimento em outra cidade, em congressos, ou desenhando cigarrinhas no Rio de Janeiro. Obrigada por me dar um lar e tranquilidade para desenvolver essa pesquisa. Ah! E obrigada por me ajudar a molhar estufas também rsss e me dar carona para a Esalq. Te amo! Aos meus cachorros, Batata e Croquete, por serem as coisas mais fofas e queridas, me receberem em casa com a maior alegria do mundo depois de cada viagem ou até uma saidinha de cinco minutos. Por me fazerem companhia durante todo o tempo que fiquei em casa escrevendo essa tese, sendo, o Croquete o tempo todo embaixo da mesa nos meus pés, enquanto a Batata vigiava a casa. Rss. Amo muito vocês meus pequenos.

Aos meus irmãos Jader e Jaks, que mesmo estando longe me ajudam sempre que podem.

A família do Rafael, principalmente, Claudia, Renato, Ro e Danilo, por toda ajuda e também por sempre me apoiarem.

In memoriam, minha cachorra Paçoca, que sempre estará no meu coração.

A Capes pela bolsa concebida e a Fapesp pelo auxilio financeiro.

"Não há garantia de que a pesquisa resolverá todos os problemas, mas nenhum problema será resolvido sem pesquisa" (Alexander H. Purcell)

SUMÁRIO

	Ç
ABSTRACT	1(
I. INTRODUÇÃO GERAL	1
Referências	14
2. TAXONOMY OF SHARPSHOOTERS FROM THE MANTIQUEIR	A MOUNTAIN
RANGE, SOUTHEASTERN BRAZIL, ASSOCIATED WITH OLIVE ORCH	HARDS21
Resumo	21
Abstract	21
2.1. Introduction	22
2.2. Material and Methods	23
2.3. Results	24
2.3.1. Subfamily Cicadellinae (sharpshooters)	24
2.3.2. Key to predominant sharpshooter species in olive orchards	24
2.3.3. New species of Cicadellini	
References	
3. FLUTUAÇÃO POPULACIONAL E INFECTIVIDADE NATURAL	L POR Xylella
astidiosa DE CIGARRINHAS EM OLIVAIS NO SUDESTE BRASILEIRO	10
Resumo	43
Resumo	
Resumo Abstract 3.1. Introdução	43
Resumo Abstract 3.1. Introdução 3.2. Material e métodos	
Resumo Abstract 3.1. Introdução 3.2. Material e métodos 3.2.1. Flutuação populacional de cigarrinhas em olivais	
 Resumo Abstract 3.1. Introdução 3.2. Material e métodos 3.2.1. Flutuação populacional de cigarrinhas em olivais 3.2.1. Avaliação da infectividade natural por <i>Xylella fastidiosa</i> 	43 43 43 44 45 45 45 45
 Resumo Abstract 3.1. Introdução 3.2. Material e métodos 3.2.1. Flutuação populacional de cigarrinhas em olivais 3.2.1. Avaliação da infectividade natural por <i>Xylella fastidiosa</i> 3.3. Resultados 	43 43 43 44 45 45 45 45
 Resumo Abstract	43
 Resumo	43
 Resumo Abstract 3.1. Introdução 3.2. Material e métodos 3.2.1. Flutuação populacional de cigarrinhas em olivais 3.2.1. Avaliação da infectividade natural por <i>Xylella fastidiosa</i> 3.3. Resultados 3.3.1. Flutuação populacional de cigarrinhas em olivais 3.3.2. Infectividade natural por <i>Xylella fastidiosa</i> 3.4. Discussão 	43
 Resumo Abstract 3.1. Introdução 3.2. Material e métodos 3.2.1. Flutuação populacional de cigarrinhas em olivais 3.2.1. Avaliação da infectividade natural por <i>Xylella fastidiosa</i> 3.3. Resultados 3.3.1. Flutuação populacional de cigarrinhas em olivais 3.3.2. Infectividade natural por <i>Xylella fastidiosa</i> 3.4. Discussão 3.1. Conclusões 	43
 Resumo Abstract. 3.1. Introdução 3.2. Material e métodos 3.2.1. Flutuação populacional de cigarrinhas em olivais 3.2.1. Avaliação da infectividade natural por <i>Xylella fastidiosa</i> 3.3. Resultados 3.3.1. Flutuação populacional de cigarrinhas em olivais 3.3.2. Infectividade natural por <i>Xylella fastidiosa</i> 3.3.2. Infectividade natural por <i>Xylella fastidiosa</i> 3.3.2. Infectividade natural por <i>Xylella fastidiosa</i> 3.4. Discussão 3.1. Conclusões 	42
 Resumo Abstract. 3.1. Introdução 3.2. Material e métodos 3.2.1. Flutuação populacional de cigarrinhas em olivais. 3.2.1. Avaliação da infectividade natural por <i>Xylella fastidiosa</i> 3.3. Resultados. 3.3.1. Flutuação populacional de cigarrinhas em olivais. 3.3.2. Infectividade natural por <i>Xylella fastidiosa</i> 3.3.2. Infectividade natural por <i>Xylella fastidiosa</i> 3.4. Discussão 3.1. Conclusões. Referências Referências 	4:
 Resumo Abstract 3.1. Introdução 3.2. Material e métodos 3.2.1. Flutuação populacional de cigarrinhas em olivais 3.2.1. Avaliação da infectividade natural por <i>Xylella fastidiosa</i> 3.3. Resultados 3.3.1. Flutuação populacional de cigarrinhas em olivais 3.3.2. Infectividade natural por <i>Xylella fastidiosa</i> 3.3.2. Infectividade natural por <i>Xylella fastidiosa</i> 3.4. Discussão 3.1. Conclusões Referências 4. TRANSMISSÃO DE <i>Xylella fastidiosa</i> subsp. <i>pauca</i> PARA OI CIGARRINHAS EM POMARES DO SUDESTE BRASILEIRO 	4:

Abstract	. 69
4.1. Introdução	. 70
4.2. Material e métodos	. 71
4.2.1. Obtenção dos insetos	. 71
4.2.2. Obtenção de plantas	. 72
4.2.3. Experimento de transmissão de X. fastidiosa subsp. pauca por cigarrinhas	. 73
4.2.4. Detecção de Xylella fastidiosa em plantas	. 73
4.2.5. Análise estatística	. 75
4.3. Resultados	. 76
4.4. Discussão	. 79
4.5. Conclusões	. 81
Referências	. 81

RESUMO

Papel de espécies de cigarrinhas (Hemiptera: Auchenorrhyncha) na disseminação de Xylella fastidiosa em oliveira na Serra da Mantiqueira

Cigarrinhas das superfamílias Membracoidea (Cicadellinae) e Cercopoidea que se alimentam de seiva de xilema das plantas são vetores ou potenciais vetores da bactéria Xylella fastidiosa, que causa doenças em diversas culturas agrícolas. Recentemente foi descrita uma nova doença associada à X. fastidiosa subsp. pauca, denominada síndrome do dessecamento foliar da oliveira (SDFO), em olivais nos estados de São Paulo (SP) e Minas Gerais (MG), cujos vetores ainda são desconhecidos. A doença ocorre na região da Serra da Mantiqueira, que apresenta uma grande diversidade e abundância de cigarrinhas, demandando estudos taxonômicos e ecológicos sobre esses insetos para investigar seu envolvimento na disseminação da bactéria. Assim, esta pesquisa foi conduzida com os objetivos de construir uma chave dicotômica para identificação e estudar a flutuação populacional, infectividade natural e competência como vetores de X. fastidiosa para espécies de cicadelíneos e cercopoídeos predominantes nos olivais dessa região. A chave dicotômica foi construída com base na morfologia externa e terminalias masculina e feminina para 17 espécies de cigarrinhas definidas como predominantes em análise faunística prévia, incluindo três novas espécies de Cicadellini aqui descritas. Para os ensaios de transmissão, adultos de 16 espécies foram prétestados para infectividade natural em plântulas sadias de Catharanthus roseus durante um período de acesso à inoculação (PAI) de 12 h. Os insetos foram então confinados em oliveiras infectadas com X. fastidiosa subsp. pauca (ST 16) por um período de acesso de aquisição de 24 h, seguido de um PAI de 24 h em oliveiras sadias. Verificou-se a transmissão por 11 espécies de cicadelíneos, Erythrogonia hertha, E. phoenicea, E. sinvali, Macugonalia cavifrons, M. leucomelas, Oragua triplehorni, Plesiommata mollicella, Scopogonalia paula, Sibovia sagata, Sonesimia grossa e Syncharina punctatissima, e por três cercopídeos, Deois schach, Notozulia entreriana e Sphenorhina rubra. As taxas de transmissão por indivíduo variaram de 0,4% para O. triplehorni a 12,9% para S. paula. Para flutuação populacional realizaram-se coletas quinzenais de cigarrinhas com cartões adesivos amarelos em olivais de Wenceslau Braz (MG), São Bento do Sapucaí (SP), Maria da Fé (MG) e Cabreúva (SP), de junho/2015 a junho/2020. Os picos populacionais ocorreram de setembro a abril, com maiores densidades (>3 indivíduos/armadilha) para Clastoptera sp. 1, M. cavifrons e S. paula. Houve correlação positiva de captura com médias mensais de temperatura e umidade relativa. Testes de qPCR em cigarrinhas coletadas por armadilhas adesivas e com rede de varredura na vegetação rasteira dos pomares e copa das oliveiras detectaram X. fastidiosa em 12 espécies, incluindo Clastoptera sp. 1, M. cavifrons e S. paula. Juntamente com E. phoenicea e E. sinvali, as três últimas espécies parecem relevantes na epidemiologia pela densidade populacional e afinidade por oliveira, infectividade natural e/ou eficiência de transmissão de X. fastidiosa. Os resultados sugerem que a primavera, verão e início do outono são períodos de maior risco de disseminação de X. fastidiosa por vetores em olivais na região.

Palavras-chave: Olea europaea L., Bactéria fitopatogênica, Taxonomia de Cicadellinae, Insetos vetores, Flutuação populacional

ABSTRACT

Role of sharpshooters and spittlebugs species (Hemiptera: Auchenorrhyncha) in olive trees in the Mantiqueira Mountain Range

Leafhoppers of the Membracoidea (Cicadellinae) and Cercopoidea superfamilies that feed on xylem plants are vectors or potential vectors of the bacterium Xylella fastidiosa, which causes diseases in several agricultural crops. Recently, a new disease associated with X. fastidiosa subsp. pauca, called olive leaf desiccation syndrome (OLDS), in olive groves, states of São Paulo (SP) and Minas Gerais (MG) are still unknown vectors. The disease occurs in the Mantiqueira Mountain range, which presents a great diversity and abundance of leafhoppers, demanding taxonomic and ecological requirements on these insects to investigate their participation in the spread of the bacterium. Thus, this research was carried out with the aim of building a dichotomic key to identify and study population fluctuation, natural infectivity and competence as vectors of X. fastidiosa for species of sharpshooters and spittlebugs predominant in olive groves in this region. The dichotomic key was constructed based on the external morphology and male and female terminalia of 17 predominant species in previous faunal analysis, including three new species of Cicadellini included here. For transmission assays, adults of 16 species were pre-tested for natural infectivity in healthy seedlings of Catharanthus roseus during a 12-h access to inoculation period (AIP). The insects were then confined in olive trees infected with X. fastidiosa subsp. pauca (ST 16) for a 24-h acquisition access period, followed by a 24-h AIP in healthy olive trees. Transmission was verified by 11 species of Cicadellinae, Erythrogonia hertha, E. phoenicea, E. sinvali, Macugonalia cavifrons, M. leucomelas, Oragua triplehorni, Plesiommata mollicella, Scopogonalia paula, Sibovia sagata, Sonesimia grossa and Syncharina punctatissima, and by three Cercopidae, Deois schach, Notozulia entreriana and Sphenorhina rubra. The transmission rates per individual ranged from 0.4% for O. triplehorni to 12.9% for S. paula. For population fluctuation, we carried out biweekly collections of leafhoppers with yellow adhesive cards in olive groves in Wenceslau Braz (MG), São Bento do Sapucaí (SP), Maria da Fé (MG) and Cabreúva (SP), from June/2015 to June/2020 Population peaks occurred from September to April, with higher densities (>3 individuals/trap) for Clastoptera sp.1, M. cavifrons and S. paula. There was a positive correlation of capture with monthly averages of temperature and relative humidity. qPCR tests on sharpshooters and spittlebugs collected by sticky traps and with sweeping nets in the ground vegetation of orchards and canopy of olive trees detected X. fastidiosa in 12 species, including Clastoptera sp.1, M. cavifrons and S. paula. Together with E. phoenicea and E. sinvali, the last three species seem relevant in epidemiology due to their population density and affinity for olive trees, natural infectivity and/or transmission efficiency of X. fastidiosa. The results suggest that spring, summer and early autumn are periods of higher risk of dissemination of X. fastidiosa by vectors in olive groves in the region.

Keywords: *Olea europaea* L., Phytopathogenic bacterium, Cicadellinae taxonomy, Insect vectors, Population fluctuation

1. INTRODUÇÃO GERAL

A bactéria fitopatogênica *Xylella fastidiosa* Wells et al. é o agente causal de doenças que acometem várias espécies vegetais de importância econômica, colonizando os vasos de xilema das plantas (Hopkins 1989). Embora apresente uma grande gama de plantas hospedeiras, estimada em mais de 600 espécies vegetais em 289 gêneros e 87 famílias botânicas (EFSA 2021), *X. fastidiosa* é patogênica para apenas uma fração dessas espécies (Sicard et al. 2018). Em hospedeiros suscetíveis, a bactéria adere à parede de vasos do xilema, onde se multiplica em grande número, formando um biofilme que pode acarretar a obstrução dos vasos e, deste modo, interromper o transporte de seiva bruta (água e sais minerais) (Tyson et al. 1985). Além disso, a patogenicidade depende da capacidade da bactéria de se movimentar sistemicamente pela planta hospedeira (Almeida et al. 2001).

Videira (*Vitis vinifera* L.) foi a primeira cultura agrícola com relatos de doença causada por *X. fastidiosa*. Relatado desde o final do século 19 no sul da Califórnia, EUA, o mal de Pierce ("Pierce's disease") em videira foi posteriormente associado à infecção por *X. fastidiosa* (Hopkins e Purcell 2002). A clorose variegada dos citros (CVC) é outra doença de grande importância causada por *X. fastidiosa* (Chang et al. 1993), detectada originalmente na região noroeste do Estado de São Paulo e Triângulo Mineiro (Rossetti et al. 1990). A bactéria também é patogênica para várias outras culturas, tais como ameixeira (*Prunus salicina* Lindl.), cafeeiro (*Coffea arabica* L.), pessegueiro (*Prunus persica* L.), alfafa (*Medicago sativa* L.), amendoeira (*Prunus dulcis* Mill.), pereira (*Pyrus communis* L.), mirtilo (*Vaccinium myrtillus* L.), cerejeira (*Prunus avium* L.), pistacheiro (*Pistacia vera* L.) e também para plantas ornamentais, como espirradeira (*Nerium oleander* L.) e olmo (*Ulmus americana* L.) (Hearon et al. 1980; Brlamsky et al. 1983; Raju e Wells 1986; Hill e Purcell 1997; Coletta-Filho e Machado 2001; Blua et al. 2001; Olmo et al. 2017; Amanifar et al. 2019).

Em 2007, *X. fastidiosa* foi detectada em plantas de oliveira (*Olea europaea* L.) nos Estados Unidos (Hernandez-Martinez et al. 2007), e associada à presença de sintomas de requeima foliar (Krugner et al. 2010). Em 2013, ocorreu o primeiro registro de *X. fastidiosa* no continente Europeu, comprometendo pomares de oliveira no sudeste da Itália com uma nova doença, que hoje é conhecida como 'síndrome do declínio rápido da oliveira' ('olive quick decline syndrome' – OQDS) (Saponari et al. 2013; Saponari et al. 2014; Saponari et al. 2016; Saponari et al. 2019). No Brasil, a bactéria foi detectada em pomares de oliveira na região sudeste do país, associada a sintomas de requeima foliar (Coletta-Filho et al. 2016), sendo denominada como 'síndrome do dessecamento foliar da oliveira' (SDFO) (Carvalho et al. 2022). Também foi detectada em pomares de oliveira na Argentina (Haelterman et al. 2015). Nos pomares brasileiros, os principais sintomas de SDFO são: folhas dessecadas, que apresentam tendência a ficarem aderidas aos ramos; morte de brotos e ramos; ramos inteiramente dessecados, desfolha parcial; e folhas com queima que se inicia na parte apical do limbo, com expressões diferentes de queima (Coletta-Filho et al. 2016; Safady et al. 2019; Carvalho et al. 2022). Os sintomas são semelhantes aos que ocorrem nos pomares europeus.

A bactéria X. fastidiosa apresenta diferentes subespécies, com características genéticas e biológicas distintas (Almeida e Nunney 2015; Vanhove et al. 2019). A subespécie associada a doenças em oliveiras varia entre as diferentes regiões afetadas, ocorrendo X. fastidiosa subsp. multiplex na Califórnia, EUA (Krugner et al. 2010), e X. fastidiosa subsp. pauca na Europa (Giampretruzi et al. 2015), Argentina (Haelterman et al. 2015) e Brasil (Coletta et al. 2016). Mesmo em nível de subespécie, ocorrem estirpes geneticamente distintas nas diferentes regiões. No Brasil, a estirpe principal encontrada em olivais dos estados de São Paulo e Minas Gerais pertence ao sequence type (ST) 16, que inclui estirpes X. fastidiosa subsp. *pauca* isoladas de cafeeiro (Coletta-Filho et al. 2016; Safady et al. 2019). Com base em análise de tipagem de sequência multilocus (MLST), Safady et al. (2019) relatou a presença de três novos genótipos de X. fastidiosa subsp. pauca infectando oliveiras, ST84, ST85 e ST86, revelando a existência de variabilidade genética em uma mesma localidade (São Bento do Sapucaí) na região da Serra da Mantiqueira. No Itália, a estirpe que afeta oliveiras pertence ao ST53 (Elbeaino et al. 2014), que também inclui estirpes que infectam espirradeira e cafeeiro na Costa Rica, bem como plantas ornamentais na região sudeste da Itália (Nunney et al. 2014; Loconsole et al. 2016). Mais recentemente, detectaram-se novos STs de X. fastidiosa subsp. *pauca* em oliveira na Espanha (ST80) e na Argentina (ST69) (EFSA 2021).

Xylella fastidiosa é transmitida por cigarrinhas pertencentes à subfamília Cicadellinae (Hemiptera: Cicadellidae) e superfamília Cercopoidae (Hemiptera: Aphrophoridae, Cercopidae e Clastopteridae), que se alimentam de seiva dos vasos de xilema das plantas, sendo assim capazes de adquirir e inocular a bactéria (Redak et al. 2004; Cornara et al. 2019). As cigarrinhas da subfamília Cicadellilnae são insetos em sua maioria polífagos, apresentando grande mobilidade entre as plantas quando estão em busca de alimento (Redak et al. 2004), sendo totalmente adaptadas a se alimentarem nos vasos de seiva do xilema, e capazes de ingerir grandes quantidades (Lopes 1996).

Após a aquisição pelas cigarrinhas nos vasos do xilema, as células de *X. fastidiosa* ficam retidas no lúmen do tubo digestivo anterior (estomodeu), na região do pré-cibário e cibário (Purcell e Finlay 1979), onde se multiplicam, formando um biofilme na superfície

cuticular que recobre o lúmen do estomodeu (Killiny e Almeida 2014). Como a relação é não circulativa (bactéria restrita ao estomodeu do vetor), quando o inseto adquire a bactéria no estágio ninfal, há perda da capacidade de transmissão, pois o forro cuticular interno do estomodeu é substituído. Porém, se a aquisição ocorrer na fase adulta, a cigarrinha será capaz de transmitir a bactéria até o final da vida (Hill e Purcell 1995).

A transmissão de *X. fastidiosa* é um processo complexo, dependente de variáveis relacionadas à planta hospedeira, inseto vetor e fitopatógeno, além de aspectos climáticos (Baldi e La Porta 2017). A eficiência de transmissão de *X. fastidiosa* por cigarrinhas pode ser influenciada por diversos fatores, tais como: espécie do vetor (Daugherty e Almeida 2009); a capacidade de adquirir e inocular o patógeno (Redak et al. 2004; Lopes et al. 2009), que pode depender da espécie de vetor e da planta hospedeira (Purcell 1980, 1990; Redak et al. 2004); concentração de patógeno nos vasos de xilema da planta (Almeida et al. 2001); genótipo da planta (Lopes et al. 2009); tempo que o inseto permanece alimentando-se na planta (Purcell e Finlay 1979); local de alimentação do inseto na planta (Daugherty et al. 2010; Rashed et al. 2011); e sintomas da doença (Daugherty et al. 2011).

Dentre os grupos de cigarrinhas consideradas vetoras de *X. fastidiosa*, a subfamília Cicadellinae é a que apresenta maior número de espécies (Cornara et al. 2019). No Brasil são conhecidas 13 espécies de cicadelíneos vetores em citros (*Citrus sinensis* L. Osbeck) (Lopes e Krugner 2016), quatro em cafeeiro (Marucci et al. 2008) e três em ameixeira (Müller et al. 2021). Para a oliveira, na Europa, a principal espécie vetora é pertencente à família Aphrophoridae, *Philaenus spumarius* (Linnaeus, 1758) (Saponari et al. 2014), a qual não ocorre no Brasil, onde os vetores em oliveira ainda são desconhecidos.

Plantas de oliveira são cultivadas em regiões de clima temperado (Coutinho et al. 2009). No Brasil, as plantações de oliveira estão em expansão, sendo cultivadas nas regiões serranas e de clima ameno, nas regiões sul e sudeste do país (Epamig 2021; Ibraoliva 2021), onde a doença SDFO associada à *X. fastidiosa* vem se apresentando como um dos principais problemas fitossanitários. Devido à carência de informações sobre a sua disseminação no Brasil, realizou-se um estudo sobre a composição das espécies de cigarrinhas que ocorrem nos pomares de oliveira localizados na Serra da Mantiqueira nos estados de São Paulo e Minas Gerais, apontando-se quais são as espécies de cigarrinhas predominantes e quais delas são possíveis vetores da bactéria (Froza 2017). Nesse estudo encontrou-se uma grande diversidade de espécies de Cicadellinae e Cercopoidea já conhecidas, como também, algumas espécies aparentemente novas, ainda não descritas, indicando-se a necessidade de estudos taxonômicos acerca dessas possíveis novas espécies.

Fatores como variação infraespecífica da bactéria, ampla gama de plantas hospedeiras e de insetos vetores, contribuem para a grande complexidade de patossistemas envolvendo *X. fastidiosa* (Jeger e Bragard 2019; Almeida et al. 2019). Portanto, sempre que *X. fastidiosa* acomete uma nova cultura deve-se investigar todos os elementos que compõem o patossistema, incluindo os possíveis vetores da bactéria e seu envolvimento com a disseminação da doença. Portanto, é fundamental investigar aspectos taxonômicos e ecológicos das espécies de cigarrinhas consideradas possíveis vetores de *X. fastidiosa* e predominantes nos pomares da região da Serra da Mantiqueira, bem como o seu papel na disseminação da doença em oliveira.

Na presente pesquisa, postulou-se que algumas das espécies de Cicadellinae encontradas em olivais da Serra da Mantiqueira são novas, procedendo-se a sua descrição e a organização de chave dicotômica para identificação de 17 espécies de cicadelíneos predominantes nos olivais daquela região (Capítulo 2). Investigou-se, também, a hipótese que espécies de cigarrinhas da subfamília Cicadellinae e superfamília Cercopoidea consideradas predominantes em levantamento faunístico prévio (Froza 2017), podem carregar naturalmente a bactéria *X. fastidiosa* e possuem capacidade de transmitir o patógeno para a oliveira (Capítulos 3 e 4). Para algumas espécies predominantes que carregam a bactéria naturalmente, analisou-se a flutuação populacional para determinar as épocas do ano de maior ocorrência. As informações obtidas sobre o envolvimento desses insetos na disseminação da doença serão de grande importância para o seu manejo nos pomares de oliveira.

Referências

- Almeida RPP, Pereira EF, Purcell AH, Lopes JRS (2001) Multiplication and movement of a citrus strain of *Xylella fastidiosa* within sweet orange. Plant Dis 85(45):382–382. https://doi.org/10.1094/PDIS.2001.85.4.382
- Almeida RPP, Nunney L (2015) How do plant diseases Caused by *Xylella fastidiosa* emerge? Plant dis 99(11):1457–1467. https://doi.org/10.1094/PDIS-02-15-0159-FE
- Almeida RPP, De La Fuente L, Koebnik R, Lopes JRS, Parnell S, Scherm H (2019) Addressing the new global threat of *Xylella fastidiosa*. Phytopathol 109: 172–174. https://doi.org/10.1094/PHYTO-12-18-0488-FI
- Amanifar N, Babaei G, Mohammadi AH (2019) *Xylella fastidiosa* causes leaf scorch of pistachio (*Pistacia vera*) in Iran. Phytopathol Mediterranea 58(2):369–378. https://doi.org/10.14601/Phytopathol_Mediter-10623

- Baldi P, La Porta N (2017) *Xylella fastidiosa*: Host range and advance in molecular identification techniques. Front Plant Sci 8:1–22. https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00944
- Blua MJ, Redak RA, Morgan JW, Costa AS (2001) Seasonal flight activity of two *Homalodisca* species (Homoptera: Cicadellidae) that spread *Xylella fastidiosa* in southern California. J Econ Entomol 94(6):1506–1510. https://doi.org/10.1603/0022-0493-94.6.1506
- Brlansky RH, Timmer LW, French WJ, Mccoy RE (1983) Colonization of the sharpshooter vectors *Oncometopia nigricans* and *Homalodisca coagulata* by xylem limited bacteria. Phytopathol 73(4):530–535. https://doi.org/10.1094/Phyto-73-530
- Carvalho IGB, Esteves MB, Froza JA, Kleina HT, Souza-Neto RR, Souza AA, Coletta-Filho HD (2022) Doenças associadas à *Xylella fastidiosa* no Brasil. RAPP 28:50–68. https://doi.org/ 10.31976/0104-038321v280003
- Chang CJ, Garnier M, Zreik L, Rossetti V, Bové JM (1993) Culture and serological detection of the xylem-limited bacterium causing variegated chlorosis and its identification as a strain of *Xylella fastidiosa*. Curr Microbiol 27(3):137–142. https://doi.org/10.1007/BF01576010
- Coletta-Filho HD, Machado MA (2001) Hospedeiros, transmissão e técnicas de diagnóstico da bactéria *Xylella fastidiosa*. Laranja 22:121–132
- Coletta-Filho HD, Francisco CS, Lopes JRS, De Oliveira AF, Da Silva LFO (2016) First report of olive leaf scorch in Brazil, associated with *Xylella fastidiosa* subsp. *pauca*. Phytopathol Mediterr 55(1):3–8. https://doi.org/10.14601/Phytopathol_Mediterr-17259
- Cornara D, Morente M, Markheiser A, Bodino N, Tsai CW, Fereres A, Redak RA, Perring T, Lopes JRS (2019) An overview on the worldwide vectors of *Xylella fastidiosa*. Entomol Generalis. https://doi.org/ 10.1127/entomologia/2019/0811
- Coutinho EF, Ribeiro FC, Cappellaro TH (2009) Cultivo de oliveira (*Olea europaea* L.). Embrapa Clima Temperado, Pelotas
- Daugherty MP, Almeida RPP (2009) Estimating *Xylella fastidiosa* transmission parameters: decouplig sharpshooter number and feeding period. Entomol Experiment applic 132:84– 92. https://doi.org/10.1111/j.1570-7458.2009.00868.x
- Daugherty MP, Lopes JRS, Almeida RPP (2010) Vector within-host feeding preference mediates transmission of a heterogeneously distributed pathogen. Ecol Entomol 35:360– 66. https://doi.org/10.1111/j.1365-2311.2010.01189.x

- Daugherty MP, Rashed A, Almeida RPP, Perring TM (2011) Vector preference for hosts differing in infection status: Sharpshooter movement and *Xylella fastidiosa* transmission. Ecol Entomol 36(5):654–662. https://doi.org/10.1111/j.1365-2311.2011.01309.x
- EFSA European Food Safety Authority (2021) Update of the *Xylella* spp. host plant database systematic literature search up to 31 December 2020. EFSA J 19(6):1–70. https://doi.org/ 10.2903/j.efsa.2021.6674
- Elbeaino T, Yassen T, Valentini F, Ben Moussa IE, Mazzoni V, D'onghia AM (2014) Identification of three potential insect vectors of *Xylella fastidiosa* in southern Italy. Phytopathol Mediterr 53(1):328–332. https://doi.org/10.14601/Phytopathol_Mediterr-14113
- Epamig Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (2021) Azeitch vai reunir a cadeia produtiva da olivicultura. Disponível em: https://epamig.wordpress.com/2021/05/14/azeitech-vai-reunir-a-cadeia-produtiva-da-olivicultura/. Acessado em 17 de maio de 2021
- Froza JA (2017) Levantamento de espécies de cigarrinhas (Hemiptera: Auchenorrhyncha) com ênfase em possíveis espécies vetoras de *Xylella fastidiosa* em pomares de oliveira na Serra da Mantiqueira. Dissertação, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo
- Giampetruzzi A, Chiumenti M, Saponari M, Donvito G, Italiano A, Loconsole G, Boscia D, Cariddi C, Martelli GP, Saldarelli P (2015) Draft genome sequence of the *Xylella fastidiosa* CoDiRO strain. Gen Announc 3(1):e01538–14. https://doi.org/10.1128/genomeA.01538-14
- Haelterman RM, Tolocka PA, Roca ME, Guzmán FA, Fernández FD, Otero ML (2015) First presumptive diagnosis of *Xylella fastidiosa* causing olive scorch in Argentina. J Plant Pathol 97(2):393. http://doi.org/10.4454/JPP.V97I2.023
- Hearon SS, Sherald JL, Kostka SJ (1980) Association of xylem-limited bacteria with elm, sycamore, and oak leaf scorch. Can J Bot 58(18):1986. https://doi.org/10.1139/b80-228
- Hernandez-Martinez R, De La Cerda KA, Costa HS, Cooksey DA, Wong P (2007) Phylogenetic relationships of *Xylella fastidiosa* strains isolated from landscape ornamentals in southern California. Phytopathol 97(7):857–864. https://doi.org/ 10.1094/PHYTO-97-7-0857
- Hill BL, Purcell AH (1995) Multiplication and movement of *Xylella fastidiosa* within grapevine and four other plants. Phytopathol 85:1368–1372. https://doi.org/10.1094/Phyto-85-1368

- Hill BL, Purcell AH (1997) Populations of *Xylella fastidiosa* in plants required for transmission by an efficient vector. Phytopathol 87:1997–1201. https://doi.org/10.1094/PHYTO.1997.87.12.1197
- Hopkins DL (1989) *Xylella fastidiosa*: xylem-limited bacterial pathogen of plants. Ann Rev Phytopathol 27(2):271–290. https://doi.org/10.1146/annurev.py.27.090189.001415
- Hopkins DL, Purcell AH (2002) *Xylella fastidiosa*: Cause of Pierce's Disease of Grapevine and Other Emergent Diseases. Plant dis 86(10):1056– 1066.https://doi.org/10.1094/PDIS.2002.86.10.1056
- Ibraoliva Instituto Brasileiro de Olivicultura (2021) Safra de 2021 de oliveira traz boas expectativas aos produtores. Disponível em: https://www.ibraoliva.com.br/noticias/detalhe/107/safra-2021-de-oliveiras-traz-boas expectativas-aos-produtores. Acessado em 17 de maio de 2021
- Jeger M, Bragard C (2019) The epidemiology of *Xylella fastidiosa*: a perspective on current knowledge and framework to investigate plant host-vector-pathogen interactions. Phytopathol 109:200–209. https://doi.org/10.1094/PHYTO-07-18-0239-FI
- Killiny N, Almeida RPP (2014). Factors affecting the initial adhesion and retention of the plant pathogen *Xylella fastidiosa* in the foregut of an insect vector. Appl Environ Microbiol 80:420–426. https://doi.org/10.1128/AEM.03156-13
- Krugner R, Johnson MW, Chen J (2010) Evolution of pathogenicity and insect transmission of *Xylella fastidiosa* strains to olive plants. California Olive Committee, Final Report 1 – 11
- Loconsole G, Saponari M, Boscia D, D'Attoma G, Morelli M, Martelli GP, Almeida R (2016) Intercepted isolates of *Xylella fastidiosa* in Europe reveal novel genetic diversity. Eur J Plant Pathol 146:85–94. https://doi.org/10.1007/s10658-016-0894-x
- Lopes JRS (1996) Mecanismos de Transmissão de *Xylella fastidiosa* por Cigarrinha. Laranja 17:79–92
- Lopes JRS, Daugherty MP, Almeida RPP (2009) Context-dependent transmission of a generalist plant pathogen: host species and pathogen strain mediate insect vector competence. Entomol Experiment Appl 131: 216–224. https://doi.org/10.1111/j.1570-7458.2009.00847.x
- Lopes JRS, Krugner R (2016) Transmission ecology and epidemiology of the citrus variegated chlorosis strain of *Xylella fastidiosa*. In: Brown JK (ed) Vector-mediated transmission of plant pathogens. American Phytopathological Society Press, Saint Paul, pp 195–208

- Marucci RC, Lopes JRS, Cavichioli RR (2008) Transmission efficiency of *Xylella fastidiosa* by sharpshooters (Hemiptera: Cicadellidae) in coffee and citrus. J Econ Entomol 101:1114–1121. https://doi.org/ 10.1603/0022-0493(2008)101[1114:TEOXFB]2.0.CO;2
- Müller C, Esteves MB, Kleina HT, Nondillo A, Botton M, Lopes JRS (2021) First sharpshooter species proven as vectors of *Xylella fastidiosa* subsp. *multiplex* in *Prunus saliciana* trees in Brazil. Trop Plant Pathol. https://doi.org/10.1007/s40858-021-00430-8
- Nunney L, Ortiz B, Russell SA, Ruiz Sánchez R, Stouthamer R (2014) The complex biogeography of the plant pathogen *Xylella fastidiosa*: genetic evidence of introductions and subspecific introgression in Central America. Plos One 9(11):e112463. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0112463
- Olmo D, Nieto A, Adrover F, Urbano A, Beidas O, Juan A, Marco-Noales E, López MM, Navarro I, Monterde A, Montes-Borrego M, Navas-Cortés JA, Landa BB (2017) First detection of *Xylella fastidiosa* Infecting cherry (*Prunus avium*) and *Polygala myrtifolia* plants, in Mallorca Island, Spain. Plant Dis 101(10):1820. https://doi.org/10.1094/PDIS-04-17-0590-PDN
- Paião FG, Meneguim AM, Casagrande EC, Leite Junior RP (2001) Envolvimento de cigarras (Homoptera, Cicadidae) na transmissão de *Xylella fastidiosa* em cafeeiro. Fitopatol Bras 27:67
- Purcell AH, Finlay A (1979) Evidence for noncirculative transmission of Pierce's disease bacterium by sharpshooter leafhoppers. Phytopathol 69:393–395. https://doi.org/10.1094/Phyto-69-393
- Purcell AH (1980) Almond leaf scorch leafhopper and spittlebug vectors. J Econ Entomol 73(6):834–838. https://doi.org/10.1093/jee/73.6.834
- Purcell AH (1990) Homopteran transmission of xylem-inhabiting bacterium. In: Harris KF (ed) Advances in Disease Vector Research, 6, Springer, New York, pp 243–266
- Raju BC, Wells JM (1986) Diseases caused by fastidious xylem-limited bacteria and strategies for management. Plant Dis 70(3):182–186. https://doi.org/10.1094/PD-70-182
- Rashed A, Killiny N, Kwan J, Almeida RPP (2011) Background matching behavior and pathogen acquisition: plant site preference does not predict the bacterial acquisition efficiency of vectors. Arthropod-Plant Interact 5:97–106. https://doi.org/10.1007/s11829-010-9118-z

- Redak RA, Purcell AH, Lopes JRS, Blua MJ, Mizell RF, Andersen PC (2004) The biology of xylem fluid-feeding insect vectors of *Xylella fastidiosa* and their relation to disease epidemiology. Ann Rev Entomol 49:243–270. https://doi.org/10.1146/annurev.ento.49.061802.123403
- Rossetti V, Garnier M, Bove JM, Beretta MJG, Teixeira ARR, Quaggio JA, Negri JDD (1990) Occurrence of xylem-restricted bacteria in sweet orange trees affected by chlorotic variegation, a new citrus disease in Brazil. Comptes Rendus de l'Academie des Sciences Serie III Sciences de la Vie 310(8):345–350
- Safady NG, Lopes, JRS, Francisco CS, Coletta-Filho HD (2019) Distribution and Genetic Diversity of *Xylella fastidiosa* subsp. *pauca* Associated with Olive Quick Syndrome Symptoms in Southeastern Brazil. Phytopathol 109:257–264. https://doi.org/10.1094/PHYTO-07-18-0273-FI).
- Saponari M, Boscia D, Nigro F, Martelli GP (2013) Identification of DNA sequences related to *Xylella fastidiosa* in oleander, almond and olive trees exhibiting leaf scorch symptoms in Apulia (Southern Italy). J Plant Pathol 95(3):668. http://doi.org/10.4454/JPP.V95I3.035
- Saponari M, Loconsole G, Cornara D, Yokomi RK, De Stradis A, Boscia D, Bosco D, Martelli GP, Krugner R., Porcelli F (2014) Infectivity and transmission of *Xylella fastidiosa* by *Philaenus spumarius* (Hemiptera: Aphrophoridae) in Apulia, Italy. J Econ Entomol 107(4):1316–1319. https://doi.org/10.1603/ec14142
- Saponari M, Boscia D, Altamura G, D'Attoma G, Cavalieri V, Zicca S, Morelli M, Tavano D, Lonconsole G, Susca L, Potere O, Savino V, Martelli GP, Palsamiro F, Dongiovanni C, Saponari A, Furmarola G, Di Carlo M (2016) Pilot project on *Xylella fastidiosa* to reduce risk assessment uncertainties. EFSA Supporting Publications - External Scientific Report. https://doi.org/10.2903/sp.efsa.2016.EN-1013
- Saponari M, Giampetruzzi A, Loconsole G, Boscia D, Saldarelli P (2019) *Xylella fastidiosa* in olive in Apulia: Where we stand. Phytopathol 109:175–186. https://doi.org/10.1094/PHYTO-08-18-0319-FI
- Sicard A, Aeilinger AR, Vanhove M, Schartel TE, Beal DJ, Daugherty MP, Almeida RPP (2018) *Xylella fastidiosa*: insights into an emerging plant pathogen. Ann Rev Phytopathol 56:1–22. https://doi.org/ 10.1146/annurev-phyto-080417-045849
- Tyson GE, Stojanovic BJ, Kuklinski RF, Divittorio TJ, Sullivan ML (1985) Scanning electron microscopy of Pierce's disease bacterium in petiolar xylem of grape leaves. Phytopathol, 75(3):264–269. https://doi.org/10.1094/Phyto-75-264

Vanhove M, Retchless AC, Sicard A, Rieux A, Coletta-Filho HD, De La Fuente L, C. Stenger DC, Almeida RPP (2019). Genomic diversity and recombination among *Xylella fastidiosa* subspecies. Appl Environ Microbiol 85(13):e02972–18. https://doi.org/10.1128/AEM.02972-18

2. TAXONOMY OF SHARPSHOOTERS FROM THE MANTIQUEIRA MOUNTAIN RANGE, SOUTHEASTERN BRAZIL, ASSOCIATED WITH OLIVE ORCHARDS

Resumo

A subfamília Cicadellinae compreende espécies de grande importância agrícola, pois são capazes de disseminar a bactéria fitopatogênica Xylella fastidiosa. Essa bactéria causa doenças em culturas importantes, sendo, a mais recente, detectada em oliveira. No Brasil, a bactéria foi identificada em pomares nos estados de São Paulo (SP) e Minas Gerais (MG), na região da Serra da Mantiqueira, em localidades que apresentaram uma grande diversidade e abundância de cigarrinhas, demostrando a necessidade de estudos sobre as espécies desse grupo de vetores para a olivicultura. Os objetivos deste trabalho foram construir uma chave dicotômica para as espécies consideras predominantes e possíveis vetores da bactéria e descrever três espécies novas de Cicadellini: Amblyscartidia sapucaiensis sp. nov., Erythrogonia sinvali sp. nov. e Hanshumba mariae sp. nov. Coletas de cigarrinhas foram realizadas em pomares de oliveiras localizados nos municípios de São Bento do Sapucaí (SP), Maria da Fé (MG) e Wenceslau Braz (MG), onde foram utilizados os seguintes métodos de coleta: cartões adesivos amarelos, rede de varredura e sugador entomológico. A chave dicotômica foi construída para 17 espécies de cigarrinhas predominantes, determinadas em análise faunística previa. Tanto as espécies predominantes como as espécies novas foram caracterizadas com base na morfologia externa e terminalias masculina e feminina.

Palavras-chave: Vetor; Cicadellinae; Xylella fastidiosa; Chave dicotômica

Abstract

The subfamily Cicadellinae comprises species of great agricultural importance because they are able to spread the phytopathogenic bacterium Xylella fastidiosa. This bacterium causes diseases in important crops, including a disease recently detected in olive trees. In Brazil, the bacterium was identified in orchards located in the states of São Paulo (SP) and Minas Gerais (MG), in the Mantiqueira Mountain Range, where both great diversity and abundance of sharpshooters were found, demonstrating the need for studies on the species of this group of vectors associated with olive trees. The main goals of this work were to provide a dichotomic key to the species considered predominant and possible vectors of the bacterium and to describe three new species of Cicadellini: Amblyscartidia sapucaiensis sp. nov., Erythrogonia sinvali sp. nov. and Hanshumba mariae sp. nov. Sharpshooters were collected in olive orchards located in the municipalities of São Bento do Sapucaí (SP), Maria da Fé (MG), and Wenceslau Braz (MG), where the following collection methods were used: yellow stick traps, sweeping nets, and insect aspirators. The dichotomic key was constructed for 17 predominant species of sharpshooters, which were determined in a previous faunistc analysis. Both the predominant species and the new species were characterized based on external morphology and male and female terminalia.

Keywords: Vector; Cicadellinae; Xylella fastidiosa; Dichotomoic key

2.1. Introduction

In the olive orchards from southeastern Brazil, specifically in the region of the Mantiqueira Mountain Range, there are about 100 species of the subfamily Cicadellinae sharpshooters, which are found both on the ground vegetation between the lines of the orchards and on the canopy of olive trees (Froza 2017).

The subfamily Cicadellinae is a very large and diverse group, with more than 2,000 species, distributed in 320 genera (Young 1968, 1977; Mejdalani 1998; Bartlett et al. 2018). Sharpshooters are present in all zoogeographical regions of the world, with the Neotropical Region being the richest in species (Young 1968, 1977; Mejdalani 1998; Bartlett et al. 2018). Cicadellinae is currently divided into two tribes: the cosmopolitan Cicadellini and the New World Proconiini. The Proconiini generally includes large sharpshooters, presenting 60 described genera (Young 1968; Mejdalani 1998; Mejdalani et al. 2019), whereas the Cicadellini includes smaller forms and has about 260 genera (Young 1977; Mejdalani 1998; Leal et al. 2020).

Sharpshooters are considered vectors or potential vectors of the bacterium *Xylella fastidiosa* Wells *et al.* They ingest sap exclusively from the xylem system of plants; this is the part of the vascular system that is infected by *X. fastidiosa* (Redak et al. 2004; Cornara et al. 2019). This bacterium causes diseases in economically important crops (Hopkins 1989). In Brazilian olive orchards, it is the causal agent of 'síndrome do dessecamento foliar da oliveira – SDFO'. Population surveys of Auchenorrhyncha carried out between 2015 and 2017 in olive orchards in the Mantiqueira Mountain Range identified 17 predominant species of Cicadellinae, including three new species of Cicadellini (Froza 2017). As these sharpshooters are possible vectors of *X. fastidiosa* for olive trees, the taxonomic study of the involved species is important for a better understanding of the relationship of sharpshooter communities found in olive orchards with the spread of the SDFO.

The main goals of this work are to provide a dichotomic key to the predominant species of sharpshooters in olive orchards from the Mantiqueira Mountain Range and to present three new species (genera *Amblyscartidia* Young, 1977, *Erythrogonia* Melichar, 1926, and *Hanshumba* Young, 1977). Although the three new species are presented in this chapter because they were discovered in the context of this thesis, one of them (*Erythrogonia*) has already been published (Froza et al. 2021) and the other two will be published in separate papers.

2.2. Material and methods

Sharpshooter collections were carried out in olive orchards located in the municipalities of São Bento do Sapucaí (SP) $(22^{\circ}38'44.13''S 45^{\circ}40'40.653''W)$, Wenceslau Braz (MG) $(22^{\circ}36'57.686''S 45^{\circ}24'28.208''W)$, and Maria da Fé (MG) $(22^{\circ}18'53.846''S 45^{\circ}22'38.700''W)$, in one orchard in each municipality, all located in the Mantiqueira Mountain Range. Collection methods were the following: (1) yellow stick traps (ISCA®, Hot Melt model) with dimensions of 30 x 10 cm, inserted on the north face of the periphery at 0.8 m above soil level, on nine trees in each orchard, which were replaced fortnightly; (2) sweeping net in the ground vegetation (30 sweeps per orchard) and the tree canopy (2 sweeps per tree, 60 trees per orchard) every three months; and (3) insect aspirator. All collected material was screened and later stored in microtubes containing 70% alcohol until the moment of study and description.

At the time of preparing the specimens for study and description, they were dried on filter paper and mounted on insect pins (double mounting). For species identifications, the male terminalia were prepared, using KOH 10%, according to the techniques described by Azevedo-Filho and Carvalho (2006). Genital structures were stored in microvials with glycerin and attached to the pins below the specimens.

Descriptions of Cicadellinae species were based on the taxonomic characters proposed by Young (1968, 1977, 1986) and Mejdalani (1993, 1998). The following works provided useful morphological information for the preparation of the dichotomic key: Young (1968, 1977), Mejdalani (1992), Cavichioli and Mejdalani (1996), Marucci et al. (2002), and Silva et al. (2013). Illustrations were prepared with the aid of a camera lucida attached to a Leica Wild M10 stereomicroscope, manually inked, and finally edited in Corel Photo-Paint. Photographs were made using a digital camera attached to a Motic SMZ-171 stereomicroscope. The specimens herein studied were deposited at the Museu de Entomologia (Esalq/USP) and the Museu Nacional (MNRJ/UFRJ). Label data were quoted exactly with a reversed virgule (\) separating lines on labels.

2.3. Results

2.3.1. Subfamily Cicadellinae (sharpshooters)

Young (1968) characterized this subfamily by the following combination of features: leafhoppers with (1) ocelli located in the crown, closer to the posterior margin than to the apex or anterolateral margin; (2) body usually not flattened dorsoventrally; (3) forewing with external margin of the inner apical cell parallel to the longitudinal wing axis; (4) posterior tibia with four regular rows of macrosetae; (5) proepisternum exposed; and (6) frontogenal suture extending onto crown and almost always approaching or reaching ocellus.

2.3.2. Key to predominant sharpshooter species in olive orchards

1(A) Posterior leg, at rest position, usually with femerotibial articulation (hind knee) not reaching the lateral lobe of the pronotum; male pygofer and subgenital plates usually with microseteae; antennal ledge usually protuberant; frons dilated, convex, with granular texture between the lateral muscle impressions; aedeagus with asymmetrical processes (Figs. 1A, 1B) 1(B) Posterior legs, at rest position, usually with femerotibial articulation (hind knee) reaching the lateral lobe of the pronotum; male pygofer and subgenital plates usually with macrosetae; antennal ledges not protuberant......Cicadellini...2 3(A) Forewing with anteapical orange or yellow spot (Fig. 2) Dilobopterus dispar (Germar, 1821) 3(B) Forewing without such spot (Fig. 3) Dilobopterus costalimai Young, 1977 5(A) Forewing red with yellow or white spots (Fig. 4) Amblyscartidia pardaliota Young, 1977 5(B) Forewing brown with bluish-white (Fig. 5) spots Amblyscartidia sapucaiensis sp. nov. 6(A) Pronotum with two large yellow spots, one on each side (Fig. 6)

6(B) Pronotum not as above7
7(A) Pronotum black with large white or yellow area
7(B) Pronotum not as above
 8(A) Forewing red without spots; pronotum with large yellow area (Fig. 7)
1853)
9(A) Body with bluish-white vellow or brown spots: male subgenital plates distinctly shorter
than the pygofer: female sternite VII produced posteriorly
9(B) Without above combination of characters
10(A) Ground color of body dark brown to black (Fig
9)
10(B) Ground color of body mostly yellow on anterior dorsum and green on forewing (Fig.
10)
11(A) Ground color of anterior dorsum vellow; apex of head with dark brown to black spot;
ground color of forewing green; aedeagal shaft, in ventral view, sagittate at apex (Figs. 11A,
11B) Scopogonalia paula Young, 1977
11(B) Without above combination of characters
12(A) Mesonotum with distinct pair of yellow spots; forewing with narrow dark brown to
black longitudinal stripes, apical portion with conspicuous yellow to orange transverse stripe
(Fig. 12) Subrasaca bimaculata Silva, Cavichioli & Mejdalani, 2013
12(B) Without above combination of characters
13(A) Forewing with membranous apical area sharply delimited but of variable size; ground
color of body varying from yellow to green (Fig. 13); hind wing with outer anteapical cell
broadened and almost touching costal margin Bucephalogonia xanthophis (Berg, 1879)
13(B) Without above combination of characters14
14(A) Dorsum with elongate dark brown to black and yellow to green longitudinal stripes
(Fig. 14) Sibovia sagata (Signoret, 1854)
14(B) Without above combination of characters15
15(A) Ground color of dorsum yellow to green mottled with many irregular dark brown to
black vermiculations and spots; head, in dorsal view, well produced anteriorly, deltoid,
subacute apically (Fig. 15) Hanshumba mariae sp. nov.
15(B) Without above combination of characters



Figures 1-17. Sharpshooter species considered predominant in olive orchards from the Mantiqueira Mountain Range (southeastern Brazil). 1, Oncometopia facialis (Signoret, 1854). 2, Dilobopterus dispar (Germar, 1821). 3, Dilobopterus costalimai Young, 1977. 4, Amblyscartidia pardaliota Young, 1977. 5, Amblyscartidia sapucaiensis sp. nov. 6, Paratubana luteomaculata (Signoret, 1853). 7, Erythrogonia sinvali sp. nov. [Froza, Quintas & Mejdalani 2021]. 8, Erythrogonia phoenicea (Signoret, 1853). 9, Macugonalia leucomelas (Walker, 1851). 10, Macugonalia cavifrons (Stål, 1862). 11, Scopogonalia paula Young, 1977. 12, Subrasaca bimaculata Silva, Cavichioli & Mejdalani, 2013. 13, Bucephalogonia xanthophis (Berg, 1879). 14, Sibovia sagata (Signoret, 1854. 15, Hanshumba mariae sp. nov. 16, Scoposcartula tobiasi Cavichioli & Mejdalani, 1996. 17, Diedrocephala bimaculata (Gmelin, 1789). 1B, aedeagus, in ventral view, of O. facialis. 11B, aedeagus and paraphyses, in lateral view, of S. paula. Scale bars of figures = 1mm. Figures from Wilson et al. (2009), except 1B (Emmrich 1984), 11B (Young 1977), 7 (Froza et al. 2021), 12 (Silva et al. 2013), 5 and 15 (present work).

2.3.3. New species of Cicadellini

2.3.3.1. Amblyscartidia sapucaiensis sp. nov. (Figs. 18–25)

Diagnosis. This new species can be distinguished by the following combination of features: (1) ground color of dorsum brown with bluish-white spots on crown, pronotum, and forewing (Figs. 5, 18); (2) aedeagus with extremely elongated, curved and slender dorsal lobe (Fig. 22); (3) paraphyses with long, slightly curved rami, each one with apical spiniform process (Figs. 21, 24); (4) female abdominal sternite VII (Fig. 25) with posterior projection, apex of latter emarginate.

Description.

Total length: male holotype 8.1 mm, male paratypes 8.1–8.2 mm (n = 2), female paratypes 8.2–8.4 mm (n = 2).

Head (Figs. 5, 18), in dorsal view, not produced anteriorly; median length of crown approximately 4/10 of interocular width and 2/10 of transocular width; anterior margin broadly rounded; without carina at transition from crown to face; ocelli located behind imaginary line between anterior eye angles, each approximately equidistant from latter and median line of crown; crown without distinct transverse concavity between ocelli, without sculpturing or setae; frontogenal suture extending onto crown and attaining ocellus; antennal ledge not protuberant, in lateral view with anterior margin oblique and convex; frons slightly flattened medially, muscle impressions distinct; epistomal suture obsolete medially; clypeus with profile continuing contour of frons.

Thorax (Figs. 5, 18), in dorsal view, with pronotal width approximately equal to transocular width of head; lateral margins slightly convergent anteriorly; dorsolateral carina complete; posterior margin concave; disk without sculpturing. Mesonotum with scutellum not striate behind transverse sulcus. Forewing with apical portion membranous; with three closed anteapical cells, their bases more proximal than claval apex; with four apical cells of which base of fourth is more proximal than base of third; without anteapical plexus of veins; texture coriaceous except apically, without sculpturing. Hind wing with vein R_{2+3} incomplete. Hind leg with femoral setal formula 2:1:1, length of first tarsomere greater than combined length of two more distal tarsomeres and with two parallel rows of small setae on plantar surface.

Color (Figs. 5, 18). Head, pronotum, and mesonotum brown. Crown with bluishwhite transverse arc. Disk of pronotum with pair of elongate bluish-white spots extending onto lateral lobes. Forewing with corium and clavus brown, with bluish-white spots. Frons with elongate white mark on middle portion. Lateral and ventral portions of body mostly pale yellow.

Male terminalia. Pygofer (Fig. 19), in lateral view, strongly produced posteriorly; posterior margin convex; surface with numerous macrosetae on posterior half; without processes. Subgenital plate (Fig. 20), in ventral view, short, not extending posteriorly nearly as far as pygofer apex; strongly narrowed near midlength; with uniseriate macrosetae. Style (Fig. 23), in dorsal view, extending posteriorly beyond apex of connective; preapical lobe distinct; apical portion curved outward, bearing few microsetae; apex subacute. Connective (Fig. 23), in dorsal view, Y-shaped. Aedeagus (Fig. 22), in lateral view, with extremely elongated, curved and slender dorsal lobe. Paraphyses (Figs. 21, 24), in dorsal view, with long, slightly curved rami, each one with apical spiniform process.

Female abdominal sternite VII (Fig. 25), in ventral view, with conspicuous posterior projection, apex of latter emarginate.

Material examined. Southeastern Brazil, Mantiqueira Mountain Range, State of São Paulo. Male holotype: "São Bento do Sapucaí \ SP [State of São Paulo] 9/II/2019 \ J. A. FROZA" (Esalq). Paratypes: one male, one female: "São Bento do Sapucaí \ SP 12/I/2019 \ J. A. FROZA" (Esalq); one male: "São Bento do Sapucaí \ SP 22/XII/2018 – 03/I/2019 \ J. A. FROZA" (MNRJ); one female: "São Bento do Sapucaí \ SP 26/XI/2019 \ J. A. FROZA" (MNRJ).

Etymology. The name of the new species refers to the type-locality (municipality of São Bento do Sapucaí).

Taxonomic notes. The new species is similar to *A. duodecimpunctata* (Germar, 1821) in the great development of the dorsal aedeagal lobe (Fig. 22). It can be distinguished from the latter species, as well as from the remaining ones of the genus, by the features given in the diagnosis.



Figures 18–25. *Amblyscartidia sapucaiensis* **sp. nov.** 18, crown and pronotum, dorsal view. 19, male pygofer, lateral view. 20, valve and subgenital plate, ventral view. 21, paraphyses, dorsal view. 22, aedeagus, lateral view. 23, style and connective, dorsal view. 24, paraphyses, lateral view. 25, female sternite VII, ventral view.

2.3.3.2. Erythrogonia sinvali sp. nov. (Figs. 26-32)

[published in https://doi.org./10.11646/ZOOTAXA.4996.2.11]

Diagnosis. The new taxon can be distinguished from other species of the genus by the following combination of features: (1) crown (Figs. 7, 26) black without conspicuous contrasting spots; (2) frons with large median spot yellow; (3) pronotum (Figs. 7, 26) black with large yellow area covering most of disk, except laterally and posteriorly; (4) forewing (Fig. 7) dark red, without contrasting spots or stripes, costal margin narrowly black, apical portion (membrane) dark brown; (5) aedeagus (Figs. 30, 31) with shaft elongate, curved dorsally, with pair of spiniform, divergent apical processes; (6) paraphyses (Fig. 29) greatly reduced; (7) basal portion of male anal tube with pair of conspicuous, spiniform curved processes (Fig. 31); (8) posterior margin of female abdominal sternite VII (Fig. 32) broadly emarginate and with broad central lobe.

Description.

Total length: male holotype 6.8 mm, male paratype 6.9 mm, female paratypes 6.9–7.0 mm (n = 3).

Head (Figs. 7, 26), in dorsal view, moderately produced anteriorly; median length of crown approximately 1/2 of interocular width and 1/3 of transocular width; anterior margin broadly rounded; ocelli located slightly behind imaginary line between anterior eye angles, each ocellus closer to adjacent eye angle than to median line of crown; coronal disk with shallow median concavity, smooth. Antennal ledge, in lateral view, with anterior margin oblique and convex. Face with frons convex, muscle impressions distinct; epistomal suture obscure medially; clypeus continuing profile of frons on upper portion and nearly horizontal on lower portion.

Thorax (Figs. 7, 26), in dorsal view, with pronotal width slightly less than transocular width of head; lateral margins slightly convergent anteriorly; posterior margin slightly concave; dorsolateral carina rectilinear, slightly oblique, not quite attaining posterior margin of eye. Mesonotum with scutellum not transversally striate. Forewing with membrane well delimited, including all apical cells except base of fourth; veins mostly distinct, not elevated; with three anteapical cells, bases of median and inner ones obscure. Other features of head and thorax as in the generic description (Young 1977, p. 767).

Color (Figs. 7, 26). Anterior dorsum (crown, pronotum, and mesonotum) black; apex of crown with irregular yellow markings extended from median spot of frons; pronotum with large, subrectangular yellow area covering most of disk, except laterally and posteriorly. Eyes dark brown. Forewing dark red, without contrasting spots or stripes; costal margin narrowly black; apical portion (membrane) dark brown. Ground color of face yellow; frons with pair of broad, longitudinal dark brown to black stripes on areas of muscle impressions; these stripes fused to each other inferiorly, delimiting large central yellow spot; clypeus with large, central triangular dark brown to black spot. Lateral lobe of pronotum yellow with dark brown to black superior area; lateral and ventral portions of meso and metathorax with large dark brown to black areas; legs mostly yellow.

Male terminalia. Pygofer (Fig. 27), in lateral view, moderately produced posteriorly; posterior margin narrowly rounded; without processes; macrosetae distributed mostly on posterior 2/3 of disk, except dorsally. Valve (Figs. 28), in ventral view, poorly developed; lateral portions slender; anterior margin emarginate medially; median portion slightly projected posteriorly. Subgenital plate (Fig. 28), in ventral view, elongate and slender, subtriangular, extending almost as far posteriorly as pygofer apex; basal margin oblique; basal 1/3 moderately expanded; distal 2/3 very narrow; apex narrowly rounded; few macrosetae distributed mostly along lateral margin of basal portion; microsetae also present; plate not fused to its counterpart at base. Connective (Fig. 29), in dorsal view, somewhat T-shaped; arms short and broad; stalk expanded apically, with median keel. Style (Fig. 29), in dorsal view, extending posteriorly beyond apex of connective; with distinct preapical lobe; apex narrow, transversely truncate. Aedeagus (Figs. 30, 31) symmetrical; shaft, in lateral view, elongate, tubular, curved dorsally; apex with pair of spiniform divergent processes; gonopore located ventroapically. Paraphyses (Fig. 29) reduced, without rami; in dorsal view, forming poorly sclerotized lobe at apex of connective. Basal portion of anal tube (Fig. 30), in lateral view, with pair of conspicuous spiniform curved processes (sickle-shaped).

Female abdominal sternite VII (Fig. 32), in ventral view, subquadrangular; median line with slight longitudinal carina; posterior margin broadly emarginate and with broad central lobe; posterolateral portions rounded, slightly more produced than central lobe.

Material examined. Southeastern Brazil, Mantiqueira Mountain Range, State of Minas Gerais. Male holotype: "Maria da Fé [approximately 1,300 m a.s.l., 22°17'S, 45°23'W], MG [State of Minas Gerais] $\$ Epamig [Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais] $\$ 1-2/V/2019 $\$ Froza, Mejdalani $\$ Pecly, Lopes" (Esalq). Paratypes: three females, same data as the holotype (Esalq, MNRJ); one male, "Maria da Fé $\$ MG I-2019 $\$ J.A. Froza" (MNRJ).

Etymology. The new species is described in honor of Dr. Sinval Silveira Neto, Senior Professor of the Department of Entomology and Acarology (Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba).

Taxonomic notes. Among the known species of Erythrogonia, the new taxon is most similar to E. separata Melichar, 1926, E. dorsalis (Signoret, 1853), E. calva (Taschenberg, 1884), and E. melichari Schmidt, 1928. In these five species, which perhaps form a natural group within the genus, the forewings are almost entirely red (Figs. 7), *i.e.*, they do not have the conspicuous spots and/or stripes that are characteristic of most *Erythrogonia* species (see digital images of the body of most species of the genus, in dorsal view, in Wilson et al. 2009). Externally, E. sinvali sp. nov. is most similar to E. separata and E. dorsalis because these three species have the disk of crown entirely black (Figs. 7, 26), whereas in E. calva and E. melichari the characteristic basal spot, contiguous to that of the pronotum, is present. The pronotal yellow area of E. sinvali sp. nov. (Figs. 7, 26) is broader than that of E. dorsalis and the male terminalia are quite distinct in these two species. In E. dorsalis (see Medler 1963, figs. 191, 192) the rami of the paraphyses are well developed (reduced in E. sinvali sp. nov., Fig. 29), the apophysis of the style is elongate and rounded apically (short and truncate apically in the new species, Fig. 29), and the apical aedeagal processes, in ventral view, form a right angle with the shaft (oblique in the new species, Fig. 31). On the other hand, the male terminalia of the new species are remarkably similar to those of E. separata (see Medler 1963, figs. 207, 208), including the reduced paraphyses (Fig. 29), the apical aedeagal processes (Fig. 31), and the conspicuous processes of the anal tube (Fig. 30); these two taxa are thus apparently closely related within the putative group of five species suggested above. However, the pronotal spot in E. separata (see Melichar 1926, Medler 1963, fig. 39, and Wilson et al. 2009) is orange, does not extend to the anterior pronotal margin or is connected to the latter only at middle, and is deeply emarginate posteriorly (yellow, broadly extended to the anterior margin, and at most slightly emarginate posteriorly in *E. sinvali* sp. nov., Figs. 7, 26); the frons has a median longitudinal black band in E. separata (Melichar 1926, Medler 1963) and a distinct yellow spot in the new species.



Figures 26–32. *Erythrogonia sinvali* **sp. nov.** 26, crown and pronotum, dorsal view. 27, male pygofer, lateral view. 28, valve and subgenital plate, ventral view. 29, style, connective and paraphyses, dorsal view. 30, aedeagus and process of anal tube, lateral view. 31, apex of aedeagus, caudal view. 32, female sternite VII, ventral view.

2.3.3.3. Hanshumba mariae sp. nov. (Figs. 33-37)

Diagnosis. This new species can be distinguished by the following combination of features: (1) apical third of ventral margin of male pygofer with small inner process bearing apical setae; (2) abdominal segment X (anal tube) without processes (Fig. 34); (3) style with apex narrow, obtuse, not foot-shaped (Fig. 35); (4) aedeagus with distinct dorsal lobe along basal 2/3 and with apical portion expanded, bearing dorsal projection (Figs. 36, 37); (5) paraphyses with distal pair of rami forceps-like, their basal half divergent from each other, distal half approximately parallel, apexes acute (Fig. 35).

Description.

Length of male holotype 4.8 mm, male paratype 4.8 mm, female paratypes 5.0-5.2 mm (n = 2).

Head (Figs. 15, 33), in dorsal view, well produced anteriorly, deltoid, rounded apically; median length of crown approximately 7/10 of interocular width and 4/10 of transocular width. Surface of crown convex, without sculpturing or setae, minutely punctate behind apex; frontogenal suture extending onto crown to near ocellus. Ocelli located slightly before imaginary line between anterior eye angles, each slightly closer to adjacent anterior eye angle than to median line of crown. Antennal ledge, in dorsal view, slightly protuberant; in lateral view, with anterior margin slightly oblique and convex. Frons with median portion slightly convex, muscle impressions inconspicuous; epistomal suture obscure medially; clypeus not protuberant, its contour continuing profile of frons.

Thorax (Figs. 15, 33), in dorsal view, with pronotal width approximately equal to transocular width of head; pronotum with lateral margins slightly convergent anteriorly; posterior margin concave; dorsolateral carena declivous anterad, indistinct at area adjacent to eye; disk transversely rugose. Mesonotum with scutellum slightly transversely striate. Forewing with membrane not sharply delimited, including at least apical cells, much of anteapical cells, and costal apical cell; with three closed anteapical cells, their bases proximal to claval apex; with four apical cells, base of fourth more proximal than base of third. Hind wing with vein R_{2+3} incomplete. Hind leg with femoral setal formula 2:1:1; length of first tarsomere approximately equal to combined length of two more distal tarsomeres, with two parallel rows of small setae on plantar surface.

Color (Figs. 15, 33). Ground color of dorsum pale yellow to green mottled with many irregular brown vermiculations and spots. Anterior margin of crown and mesonotum with larger spots. Membrane of forewing translucent, with green spots on anteapical cells.
Face, lateral and ventral portions of thorax, and legs mostly yellow; superior portions of antennal ledge and lateral lobe of pronotum with brown spot.

Male terminalia. Pygofer (Fig. 34), in lateral view, strongly produced posteriorly; distal half slightly narrower than basal half; posterior margin broadly rounded; apical third of ventral margin with small inner process bearing setae, additional processes absent; macrosetae distributed mostly on posterior portion and extending anteriorly along ventral margin. Subgenital plate, in ventral view, subtriangular, with basal 1/4 distinctly expanded and then narrowing gradually towards apex; surface with mostly small macrosetae along outer margin, microsetae also present; plates not fused to each other at base; in lateral view, not extending as far posteriorly as pygofer apex. Connective (Fig. 35), in dorsal view, Y-shaped; stalk with slight median keel. Style (Fig. 35), in dorsal view, extending posteriorly beyond apex of connective; with distinct outer preapical lobe; outer preapical area bearing setae; apex narrow, obtuse, not foot-shaped. Aedeagus (Figs. 36, 37) symmetrical; shaft, in lateral view, elongate; basal 2/3 with distinct dorsal lobe; apical portion expanded, with slight dorsal projection, dorsal margin straight from projection to apex; lateral surface of shaft with elongate longitudinal flange located near ventral margin; gonoduct distinct, gonopore located ventroapically. Paraphyses (Fig. 35), in dorsal view, with stalk elongate, slightly constricted medially, articulated with apex of connective; with two pairs of rami: proximal pair directed anterad, large, ill-defined, expanded apically; distal pair directed posterad, forceps-like, basal half of rami divergent from each other, distal half approximately parallel, their apexes acute. Anal tube (Fig. 37), in lateral view, with segment X not bearing inner process.

Female unknown.

Material examined. Southeastern Brazil, Mantiqueira Mountain Range, State of Minas Gerais. Male holotype: "Wenceslau Braz \ MG [State of Minas Gerais] 15-31/X/2019 \ J. A. FROZA" (Esalq). Paratypes: one male, "Wenceslau Braz \ MG 01-16/XI/2018 \ J. A. FROZA" (MNRJ); two females, same data as the male paratype (Esalq, MNRJ).

Etymology. The new species is described in honor of Maria Aparecida Froza, author's mother, who greatly encouraged her in the scientific career and life.

Taxonomic notes. The new taxon, *H. mariae* **sp. nov.**, shares the same color pattern found in other species already described within the genus *Hanshumba* Young, 1997, *viz.*, yellow to green dorsum mottled with many irregular dark brown vermiculations and spots (Young 1977, Mauro-Barr and Carvalho 2008, Froza et al. 2018). This shared color pattern makes the association between males and females of the same species very difficult (Froza et al. 2018). The new species shares the presence of two pairs of paraphyses rami with *H*.

setifera Froza, Cavichioli, Costa and Mejdalani, 2018 and *H. teresa* Froza, Cavichioli, Costa and Mejdalani, 2018 (see Froza et al. 2018, figs. 3, 8), whereas the other three known species have just one pair. The characters provided above in the diagnosis will readily distinguish *H. mariae* **sp. nov.** from the remaining ones of the genus.



Figures 33–37. *Hanshumba mariae* **sp. nov.** 33, crown and pronotum, dorsal view. 34, male pygofer, lateral view. 35, subgenital plates, styles, connective, and paraphyses, dorsal view. 36, aedeagus and anal tube, ventral view. 37, aedeagus and anal tube, lateral view. A = aedeagus, AA = apex of aedeagus, AT = anal tube, C = connective, RP = ramus of paraphyses, S = style.

References

- Azevedo-Filho WS, Carvalho GS (2006) Cigarrinhas de citros no Rio Grande do Sul taxonomia. EDIPUCRS, Porto Alegre
- Bartlett CR, Deitz LL, Dmitriev DA, Sanborn AF, Soulier-Perkins AS, Wallace MS (2018)The diversity of the true hoppers (Hemiptera: Auchenorrhyncha). *In*: Foottit RG, Adler PH (ed) Insect biodiversity: science and society. Wiley-Blackwell, 2:501–590
- Carvalho IGB, Esteves MB, Froza JA, Kleina HT, Souza-Neto RR, Souza AA, Coletta-Filho HD (2022) Doenças associadas à Xylella fastidiosa no Brasil. RAPP 28:50–68. https://doi.org/ 10.31976/0104-038321v280003
- Cornara D, Morente M, Markheiser A, Bodino N, Tsai CW, Fereres A, Redak RA, Perring T, Lopes JRS (2019) An overview on the worldwide vectors of *Xylella fastidiosa*. Entomol Gen. https://doi.org/ 10.1127/entomologia/2019/0811
- Emmrich R (1984) Weiteres zur Kenntnis der Gattung *Oncometopia* Stål (s. str.) (Homoptera, Auchenorrhyncha, Cicadellidae, Cicadellinae). Reichenbachia 22(15):113–124
- Froza JA (2017) Levantamento de espécies de cigarrinhas (Hemiptera: Auchenorrhyncha) com ênfase em possíveis espécies vetoras de Xylella fastidiosa em pomares de oliveira na Serra da Mantiqueira. Dissertação, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo
- Froza JA, Cavichioli RR, Costa LAA, Mejdalani G (2018) Two new species of *Hanshumba* from Southeastern Brazil and a key to males of the genus (Insecta: Hemiptera: Cicadellidae: Cicadellini). Rev Bras Entomol 62:315–318. https://doi.org/10.1016/j.rbe.2018.08.005
- Froza JA, Quintas V, Mejdalani G (2021) A new species of *Erythrogonia* Melichar, 1926 (Insecta: Hemiptera: Cicadellidae: Cicadellini) from the Mantiqueira mountain range, southeastern Brazil, associated with olive orchards. Zootaxa 4996(2):374–382. https://doi.org/10.11646/zootaxa.4996.2.11
- Hopkins DL (1989) *Xylella fastidiosa*: xylem-limited bacterial pathogen of plants. Ann Rev Phytopathol 27(2):271–290. https://doi.org/10.1146/annurev.py.27.090189.001415
- Leal AH, Creão-Duarte AJ, Mejdalani G (2020) Phylogenetic analysis of the South American sharpshooter genus *Scopogonalia* Young, 1977 (Insecta: Hemiptera: Cicadellidae), with implications for conservation. Zootaxa 4885(4):487–508. https://doi.org/10.11646/zootaxa.4885.4.2

- Marucci RC, Cavichioli RR, Zucchi RA (2002) Espécies de cigarrinhas (Hemiptera, Cicadellidae, Cicadellinae) em pomares de citros da região de Bebedouro, SP, com descrição de uma espécie nova de *Acrogonia* Stål. Rev Bras Entomol 46(2):149–164
- Mauro-Barr TT, Carvalho RA (2008) Two new species of the Neotropical genus Hanshumba Young from Brazil (Hemiptera: Cicadellidae: Cicadellini). Stud Neotr Fau Envir 43:227– 235. https://doi.org/10.1080/01650520701737973
- Medler JT (1963) A review of the genus *Erythrogonia* Melichar (Homoptera, Cicadellidae). Misc Pub Entomol Soc Am 4:1–33
- Mejdalani G (1992) Uma nova espécie de *Amblyscartidia* Young, 1977 do sudeste do Brasil (Homoptera, Cicadellidae, Cicadellinae). Rev Bras Biol 52(1):37–40
- Mejdalani G (1993) Morfologia da cabeça de *Versigonalia ruficauda* (Walker, 1851), com notas sobre a terminologia (Homoptera, Cicadellidae, Cicadellinae). Rev Bras Entomol 37:279–288
- Mejdalani G (1998) Morfologia externa dos Cicadellinae (Homoptera, Cicadellidae): comparação entre *Versigonalia ruficauda* (Walker) (Cicadellini) e *Tretogonia cribrata* Melichar (Proconiini), com notas sobre outras espécies e análise da terminologia. Rev Bras Zool 15:451–544. https://doi.org/10.1590/S0101-81751998000200015
- Mejdalani G, Domahovski AC, Rendón-Mera DI, Cavichioli RR (2019) *Tretogonia* Melichar (Hemiptera: Cicadellidae: Proconiini): two new species from South Brazil and a redescription of *T. dentalis* Emmrich, 1998. Europ J Tax 513:1–14. https://doi.org/10.5852/ejt.2019.513
- Melichar L (1926) Monographie der Cicadellinen. III. Ann Hist-Nat Mus Nat Hung 23:273– 394
- Redak RA, Purcell AH, Lopes JRS, Blua MJ, Mizell RF, Andersen PC (2004) The biology of xylem fluid-feeding insect vectors of *Xylella fastidiosa* and their relation to disease epidemiology. Ann Rev Entomol 49:243–270. https://doi.org/ 10.1146/annurev.ento.49.061802.123403
- Silva RS, Cavichioli RR, Mejdalani G (2013) Descriptions of two new Brazilian Subrasaca species and redescriptions of S. flavolineata (Signoret, 1855) and S. curvovittata (Stål, 1862) comb. nov. (Hemiptera: Cicadellidae: Cicadellini). Zootaxa 3637(4):450–461. https://doi.org/10.11646/zootaxa.3637.4.4

- Wilson MR, Turner JA, McKamey SH (2009) Sharpshooter leafhoppers of the World (Hemiptera: Cicadellidae subfamily Cicadellinae). Amgueddfa Cymru - National Museum Wales: http://naturalhistory.museumwales.ac.uk/Sharpshooters. Accessed 23 november 2021
- Young DA (1968) Taxonomic study of the Cicadellinae (Homoptera: Cicadellidae). Part 1. Proconiini. Bull US Nat Mus 261:1–287. https://doi.org/10.5479/si.03629236.261.1
- Young DA (1977) Taxonomic study of the Cicadellinae (Homoptera: Cicadellidae). Part 2. New World Cicadellini and the genus *Cicadella*. Tech Bull N Carol Agric Exp Stn 239:1– 1135
- Young DA (1986) Taxonomic study of the Cicadellinae (Homoptera: Cicadellidae). Part 3. Old World Cicadellini. Tech Bull N Carol Agric Exp Stn 281:1–639

ADVERTÊNCIA

ESTA TESE NÃO CONSTITUI UMA PUBLICAÇÃO NO SENTIDO DO **ARTIGO 9 DO ICZN** E, PORTANTO, QUAISQUER ATOS NOMENCLATÓRIOS NELA CONTIDOS TORNAM-SE SEM EFEITO PARA PRINCÍPIOS DE PRIORIDADE E HOMONÍMIA.

WARNING

THIS THESIS SHOULD NOT BE CONSIDERED AS A PUBLICATION IN THE SENSE OF THE **ARTICLE 9 OF ICZN**. THEREFORE, ANY NOMENCLATURAL ACTS HEREIN PROPOSED ARE CONSIDERED VOID FOR THE PRINCIPLES OF PRIORITY AND HOMONYMY.

3. FLUTUAÇÃO POPULACIONAL E INFECTIVIDADE NATURAL POR Xylella fastidiosa DE CIGARRINHAS EM OLIVAIS NO SUDESTE BRASILEIRO

Resumo

Cigarrinhas que se alimentam de seiva xilemática são vetores da bactéria Xylella fastidiosa, que causa doenças em diversas culturas. Aqui estudou-se a flutuação populacional de espécies de cigarrinhas de Cicadellinae e Cercopoidea (Hemiptera: Auchenorrhyncha), previamente identificadas como predominantes e potenciais vetores de X. fastidiosa em olivais nos Estados de São Paulo (Cabreúva e São Bento do Sapucaí) e Minas Gerais (Maria da Fé e Wenceslau Braz), Brasil, onde essa bactéria está associada à síndrome do dessecamento foliar da oliveira. Os insetos foram amostrados quinzelmente por cartões adesivos amarelos pendurados a 0,8 m acima do solo na periferia da copa de nove oliveiras por pomar, de junho/2015 a junho/2020. Os picos populacionais ocorreram de setembro a abril, com maiores densidades (>3 indivíduos/armadilha) para Clastoptera sp. 1, Macugonalia cavifrons e Scopogonalia paula. Houve correlação positiva de captura com médias mensais de temperatura e umidade relativa. Testes de qPCR em cigarrinhas coletadas por armadilhas adesivas e com rede de varredura na vegetação rasteira dos pomares e copa das oliveiras, detectaram X. fastidiosa em 12 espécies, incluindo Clastoptera sp. 1, M. cavifrons e S. paula. Os resultados sugerem que a primavera, verão e início do outono são períodos de maior risco de disseminação de X. fastidiosa por vetores na região.

Palavras-chave: Inseto vetor; Sazonalidade; Bactéria fitopatogênica; Olea europea L

Abstract

Xylem-sap feeding leafhoppers (Hemiptera: Cicadellinae) and spittlebugs (Hemiptera: Cercopoidea) are vectors of Xylella fastidiosa, which causes diseases in various crops. Here we studied the population fluctuation of predominant leafhoppers and spittlebugs that are potential vectors of X. fastidiosa in olive groves in the states of São Paulo (Cabreúva and São Bento do Sapucaí) and Minas Gerais (Maria da Fé and Wenceslau Braz), Brazil, where this bacterium is associated with olive leaf drying syndrome. Insects were sampled fortnightly by yellow sticky cards hanging at 0.8 m above ground on the outer canopy of nine olive trees per orchard, from June/2015 to June/2020. Population peaks occurred from September to April, with higher densities (>3 individuals/trap) for Clastoptera sp.1, Macugonalia cavifrons and Scopogonalia paula. There was a positive correlation of capture with monthly averages of temperature and relative humidity. qPCR tests on leafhoppers collected by sticky traps and with sweeping nets in the undergrowth of orchards and canopy of olive trees detected X. fastidiosa in 12 species, including Clastoptera sp.1, M. cavifrons and S. paula. These results suggest that spring, summer and early autumn are periods of greater risk of spread of X. fastidiosa by vectors in the region.

Keywords: Insect vectors; Seasonality; Phytopathogenic bacterium; Olea europea L

3.1. Introdução

Cigarrinhas da subfamília Cicadellinae (Hemiptera: Cicadellidae) e superfamília Cercopoidea (Hemiptera: Aphrophoridae, Cercopidae e Clastorpteridae) são insetos sugadores de plantas, especializados em alimentação em vasos de xilema (Cornara et al. 2019). Devido a este hábito alimentar, são considerados potenciais vetores da bactéria fitopatogênica *Xylella fastidiosa* Wells et al., que coloniza o xilema de plantas, causando doenças de importância econômica em várias culturas agrícolas (Redak et al. 2004; Cornara et al. 2019). No Brasil, a oliveira (*Olea europaea* L.) é a mais recente cultura infectada por *X. fastidiosa* (Coletta-Filho et al. 2016), sendo a doença denominada síndrome do dessecamento foliar da oliveira (SDFO) (Carvalho et al. 2022).

Análises faunísticas realizadas em pomares de oliveira no sudeste do Brasil, na região da Serra da Mantiqueira, revelaram a ocorrência de 97 espécies de cicadelíneos e 10 espécies de cercopoídeos. Dentre essas espécies, 20 (17 cicadelíneos e três cercopoídeos), foram identificadas como predominantes, sendo consideradas possíveis vetoras da bactéria em oliveira (Froza 2017). Entretanto, há poucas informações ecológicas sobre tais espécies nessa região, tais como épocas de maior ocorrência, plantas hospedeiras e ocorrência natural da bactéria *X. fastidiosa* nas cigarrinhas (infectividade natural).

Estudos de flutuação populacional são essenciais para entender como as populações de insetos se comportam ao longo do tempo, como também, nas diferentes estações do ano, em relação ao número de indivíduos (Silveira Neto et al. 1976). Quando se trata de insetos vetores de patógenos, o conhecimento da variação sazonal das espécies consiste em uma importante ferramenta para o controle da doença, devido às suas implicações epidemiológicas (Daugherty e Almeida 2019; Sisterson et al. 2020; Beal et al. 2021). Também é importante reconhecer quais espécies de cigarrinhas mostram infectivade natural, indicativo de que são capazes de adquirir *X. fastidiosa* de plantas hospedeiras infectadas e carregar a bactéria no campo, podendo assim, ter um papel chave na disseminação da doença (Gruber & Daugherty 2013; Cornara et al. 2016).

O presente estudo tem como objetivos avaliar a flutuação populacional e períodos de ocorrência de espécies de Cicadellinae e Cercopoidea predominantes em pomares de oliveira localizados nos estados de São Paulo e Minas Gerais, na região da Serra da Mantiqueira, assim como avaliar as taxas de infectividade natural das cigarrinhas por *X. fastidiosa*, de modo a subsidiar a identificação de espécies potencialmente mais relevantes na disseminação do patógeno, e a definição de estratégias de manejo desses insetos.

3.2. Material e métodos

3.2.1. Flutuação populacional de cigarrinhas em olivais

3.2.1.1. Definição das áreas experimentais e métodos de amostragem

Para a avaliação da flutuação populacional, foram selecionados quatro pomares de oliveiras, em diferentes altitudes, onde já foi detectada a presença de *X. fastidiosa* infectando as oliveiras, sendo estes localizados na Serra da Mantiqueira nos municípios de Wenceslau Braz/MG, São Bento do Sapucaí/SP, Maria da Fé/MG e Cabreúva/SP (Tabela 1).

As coletas de cigarrinhas foram realizadas nos pomares com armadilhas do tipo cartão adesivo amarelo, com dimensões de 30 x 10 cm (ISCA®, modelo Hot Melt). Em cada pomar foram selecionadas nove árvores, nas quais foi instalado um cartão adesivo amarelo a uma altura de 0,8 m do solo, em ramo da periferia da face norte da copa. Estabeleceu-se uma distância de 20 a 30 m entre cada ponto de amostragem.

As cigarrinhas foram amostradas de junho de 2015 a junho de 2020. As armadilhas foram trocadas a cada 15 dias e, após esse período, foram embaladas em sacos de polietileno transparente e enviadas ao Laboratório de Insetos Vetores de Fitopatógenos, no Departamento de Entomologia e Acarologia da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" (Esalq), Universidade de São Paulo (USP). Todos os espécimes de Cicadellinae e Cercopoidea capturados nas armadilhas adesivas foram contabilizados e identificados, sob microscópio estereoscópico, em nível taxonômico de espécie, com base em caracteres de morfológicos externos e da genitália dos machos, utilizando-se chaves dicotômicas (Young 1968, 1977; Dietrich 2005) e na comparação com exemplares das coleções de referência do Museu de Entomologia e do Laboratório de Insetos vetores de Fitopatógenos, ambos localizados no Departamento de Entomologia e Acarologia Esalq/USP.

Baseando-se em resultados de análise faunística realizada com dados de coleta de Auchenorrhyncha no período de junho/2015 a maio/2017 (Froza, 2017), selecionaram-se, para a análise de flutuação populacional, duas a quatro espécies de Cicadellinae e/ou Cercopoidea consideradas predominantes por localidade. Froza (2017) classificou como predominantes àquelas espécies que se apresentaram como dominantes, muito abundantes, muito frequentes e constantes, em relação a outras espécies de Auchenorrhyncha coletadas na mesma localidade. As espécies selecionadas foram: *Macugonalia cavifrons* (Stål, 1862), *Clastoptera* sp. 1, *Scopogonalia paula* Young, 1977, e *Erythrogonia phoenicea* (Signoret, 1853), em Maria da Fé; *M. cavifrons, Clastoptera* sp. 1 e *S. paula*, em São Bento do Sapucaí; *Dilobopterus*

costalimai Young, 1977 e Deois flavopicta (Stål, 1854), em Cabreúva; e M. cavifrons, Clastoptera sp. 1, S. paula e Paratubana luteomaculata (Signoret, 1853), em Wenceslau Braz.

Foram coletados dados de temperatura e umidade relativa a cada hora, em áreas próximas (até 4 km de distância) dos pomares de oliveira onde foram realizadas as amostragens. Nos pomares localizados em Cabreúva/SP e São Bento do Sapucaí/SP, os dados foram coletados utilizando registradores portáteis do tipo "data logger" (Marca Testo, modelo 174H). No pomar em Maria da Fé os dados de temperatura e umidade foram obtidos do website do INMET (https://portal.inmet.gov.br/) que possui uma estação meteorológica automática localizada no Campo Experimental de Maria da Fé, da Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (CEMF/Epamig). No pomar de Wenceslau Braz os dados foram coletados por uma estação meteorológica instalada em propriedade vizinha.

Para a análise da flutuação populacional, utilizaram-se médias mensais de temperatura e umidade relativa, que foram calculadas pelas equações, conforme Silveira Neto et al. (1976):

$$Tm = \frac{t_7 + t_{14} + 2t_{21}}{4}$$

$$URm = \frac{UR_7 + UR_{14} + UR_{21}}{3}$$

Onde:

Tm= temperatura média mensal; t_7 = temperatura média mensal às 7:00 h; t_{14} =temperatura média às 14:00 h; t_{21} =temperatura média às 21:00 h; URm=umidade relativa média mensal; UR7=umidade relativa média às 7:00 h; UR14=umidade relativa média às 14:00 h; UR21=umidade relativa média as 21:00 h.

3.2.1.2. Análise estatística

A correlação entre as variáveis climáticas, médias mensais de temperatura (Tm) e umidade (URm), e o número médio mensal de cigarrinhas capturadas por armadilha, foi realizada através do coeficiente de correlação de Spearman. Realizaram-se análises por espécie de cigarrinha em cada localidade, avaliando-se a correlação do dado populacional da espécie com cada uma das variáveis climáticas (P < 0,05), usando-se o software estatístico R (R Core Team 2021).

Localidade (Cidade/Estado/fazenda)	Coordenada Geográfica	Altitude (m)	Cultivar	Idade do pomar (anos)	Vegetação entorno	Vegetação rasteira
Wenceslau	22°36'57,686''S	1780	Maria da	12	Campos de altitude, Mata de pinhais e	Gramíneas e
Braz/MG/Macieira	45°24'28,208''W	1780	Fé	12	floresta ombrófila mista	herbáceas
São Bento do Sapucaí/SP/São José	22°38'44,13''S 45°40'40,653''W	1512	Arbequina	13	Floresta ombrófila mista, mata de araucária, frutífera temperada (pêssego, ameixa, maça)	Gramíneas e herbáceas
Maria da Fé/MG/Epamig	22°18'53,846''S	1210	Grappolo	11	Mata de araucária, pastagem, frutíferas	Gramíneas e
	45°22'38,700''W	1310			temperadas (atemóia, pêssego, ameixa)	herbáceas
Cabreúva/SP/Taguá	23°16'27,193''S 47°9'7,557''W	883	Arbequina	9	Eucalipto, pastagem e pinheiros	Gramíneas

Tabela 1. Características dos pomares de oliveira selecionados para coleta de cigarrinhas na Serra da Mantiqueira

3.2.1. Avaliação da infectividade natural por Xylella fastidiosa

Para a avaliação da infectividade natural foram selecionadas as espécies de cigarrinhas predominantes nos pomares de oliveira avaliados no presente estudo (Tabela 1), que foram identificadas a partir da análise faunística feita por Froza (2017): Amblyscartidia pardaliota Young, 1977, Amblyscartidia sapucaienses sp. nov., Bucephalogonia xanthophis (Berg, 1879), Clastoptera sp.1, D. flavopicta, Diedrocephala bimaculata (Gneli, 1789), E. phoenicea, Erythrogonia sinvali Froza, Quintas & Mejdalani, 2021, M. cavifrons, Macugonalia leucomelas (Walker, 1851), Oncometopia facialis (Signoret, 1853), P. luteomaculata, S. paula, Scoposcartula tobiasi Cavichioli & Mejdalani, 1996, Sibovia sagata China, 1927, Sphenorhina rubra (Linnaeus, 1758) Subrasaca bimaculata Silva, Cavichioli & Mejdalani, 2013. Também foram incluídas na avaliação as espécies Ferrariana trivitatta (Signoret, 1854) e Sonesimia grossa (Signoret, 1854), previamente identificadas como vetores de X. fastidiosa em citros (Lopes 1996; Roberto et al. 1996; Redak et al. 2004; Lopes e krugner 2016), e outras espécies coletadas nos referidos pomares, que fazem parte dos grupos taxonômicos estudados: Deois schach (Fabricius, 1787), Erythrogonia hertha Medler, 1963, Hortensia similis (Walker, 1851), Macugonalia geographica (Signoret, 1855), Notozulia entreriana (Berg, 1879), Oragua triplehorni Young, 1977, Plesiommata mollicella (Fowler, 1900), Selvitsa humeralis (Signoret, 1853) e Syncharina punctatissima (Signoret, 1854).

As coletas das espécies selecionadas foram realizadas nos pomares localizados nos municípios São Bento do Sapucaí (SP) e Maria da Fé (MG) (Tabela 1), onde relatou-se pela primeira vez a presença desse patógeno infectando oliveiras na Serra da Mantiqueira (Coletta-filho et al. 2016), por apresentarem incidências mais elevadas de oliveiras infectadas por *X*. *fastidiosa* (nível de inóculo mais elevado).

As cigarrinhas foram coletadas por meio de cartões adesivos amarelos posicionados na copa das oliveiras conforme descrito anteriormente, no período de janeiro/2018 a janeiro/2020. Neste período também foram coletados espécimes com rede de varredura na vegetação espontânea presente nas entrelinhas dos pomares, como também coletas na copa das árvores de oliveira. Todas as cigarrinhas selecionadas foram acondicionadas em microtubos plásticos contendo álcool absoluto e armazenadas em ultrafreezer a -80°C, para melhor conservação do material, até o momento da extração do DNA. Cada amostra preparada para extração foi composta por três cabeças de cigarrinha de uma mesma espécie, localidade e método de coleta.

de DNA foi baseada no protocolo CTAB de А extração (Brometo cetiltrimetilamônio) desenvolvido por Rogers e Bendich (1998), com modificações. Inicialmente, as amostras contendo três cabeças de cigarrinhas de uma mesma espécie foram adicionadas a microtubos e 2,0 ml de fundo arredondado contendo uma "bead" de aço inoxidável de 5 mm de diâmetro. Os tubos foram inseridos no equipamento TissueLyser (modelo LT, Qiagen Sample and Assay Technologies), onde as amostras foram trituradas a 35Hz (= 35 oscilações) por 8 min. Após a trituração, adicionou-se por amostra 480 µl do tampão de extração (30 µl de H₂O Milli-Q ou deionizada, 120 µl de Tris-HCL 1M pH 8,0, 84 μl de EDTA 0,5 M pH 8,0, 240 μl de NaCl 5M, 6 μl de 140mM M β-Mercaptoetanol) em capela de exaustão; posteriormente adicionou-se 126 µl de uma nova solução, composta por 120 µl de CTAB 10% e 6 µl de proteinase K (20 mg/ml) (Invitrogen 25530-015). Incubaramse as amostras por 60 min a 65 °C, agitando-se vigorosamente em "vortex" a cada 15 min. Em seguida, as amostras foram deixadas em temperatura ambiente por 5 min. Posteriormente, em capela de exaustão, transferiu-se todo o conteúdo liquido para tubos novos de 1,5 ml, nos quais adicionou-se 500 µl de clorofórmio: álcool isoamílico (CIA) (24:1), agitando-se manualmente por inversões durante 5 min. Os tubos contendo as amostras foram centrifugados a 14.000 rpm por 10 min a 25°C (Centrífuga Modelo MIKro 22R, Hettich). Ainda na capela, aproximadamente 400 µl do sobrenadante obtido na centrifugação foi transferido para tubos novos de 1,5 ml. Adicionou-se, novamente, 400 µl de CIA e agitou-se manualmente delicadamente cada tubo por inversão durante 3 min. Em seguida, os tubos foram centrifugados por 7 min a 14.000 rpm a 25°C. Novamente na capela, transferiu-se aproximadamente 400 µl do sobrenadante para novos tubos de 1,5 ml, adicionando-se, 400 µl de álcool isopropílico gelado e 180 µl de acetado de amônia 10M, para a precipitação do DNA. Agitou-se delicadamente por inversão por 2 min, sendo os tubos em seguida acondicionados em freezer (-20° C) por 2 h ou no ultrafreezer (-80° C) por 20 min. Após esse período, as amostras foram centrifugadas a 14.000 rpm por 15 min a 4°C, sendo o sobrenadante descartado cuidadosamente, ficando apenas o "pellet". Adicionou-se 300 µl de álcool etílico 70% gelado e centrifugou-se a 14.000 por 5 min a 4°C. Novamente o sobrenadante foi descartado e o "pellet" foi seco em estufa por 20 min a 37°C, ou até não restar nenhuma gota de álcool. Em seguida as amostras foram ressuspendidas em 50 µl de solução contendo tampão TE 1/10 (Tris-HCl 1M pH 7,5, EDTA 0,5 M, H₂O destilada) e RNAse (Promega A7973) e incubados por 30 min a 37°C. Posteriormente foram estocados em freezer (-20°C) até a realização da PCR em tempo real (qPCR).

Anteriormente à qPCR, o DNA foi quantificado com um espectrofotômetro de microplacas (modelo Epoch, BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT), padronizando-se a concentração em 20 a 100 ng/µl de DNA por amostra. O qPCR foi realizado utilizando os pares de primers CVC-1/CCSM-1 com sonda CVC (Oliveira et al. 2002) e 5x Hot FIREPol® Blend Master Mix (Solis BioDyne). As condições de amplificação foram: um ciclo de préincubação a 50 °C por 2 min; um ciclo de desnaturação a 95 °C por 2 min e 40 ciclos de desnaturação a 95 °C por 15 s e anelamento/extensão a 60 °C por 1 min depois de cada ciclo, em equipamento ViiA7 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster, CA). Em cada reação foi adicionado um controle positivo (amostra de DNA de cabeças de cigarrinhas, previamente considerada positiva para *X. fastidiosa*) e dois controles negativos (água ultrapura e amostra de DNA de cabeças de cigarrinhas obtidas de colônia livre de *X. fastidiosa*). Todas as amostras foram testadas em duplicata. Amostras que apresentaram valores de CT \leq 36 (cycle threshold) foram consideradas positivas, de acordo com Fadel et al. (2014).

Os dados de percentual de amostras de cigarrinhas positivas para *X. fastidiosa* foram analisados com o modelo linear generalizado (GLM) com distribuição binomial com função de ligação logit. O ajuste do modelo foi avaliado pelo envelope simulado meio normal com o pacote "hnp" (Moral et al. 2017) do software estatístico R (R Core Team 2021). Dados que apresentaram diferenças significativas passaram por comparação de médias com contrastes do modelo selecionado (p<0,05) utilizando a função "glht" do pacote Multicomp (Hothorn et al. 2008).

3.3. Resultados

3.3.1. Flutuação populacional de cigarrinhas em olivais

Todas as espécies de cigarrinhas avaliadas apresentaram picos populacionais entre os meses mais quentes e úmidos, no período de setembro a fevereiro, exceto para a espécie *Clastoptera* sp. 1, cuja população adulta atingiu o pico de fevereiro a abril (final do verão e início do outono) (Figuras 38, 39, 40, 41).

Os maiores picos populacionais (4-6 insetos / armadilha / período) foram observados para *Clastoptera* sp.1, *M. cavifrons* e *S. paula* em São Bento do Sapucaí (Figura 39), e para as espécies *S. paula* e *E. phoenicea* em Maria da Fé (Figura 40). Os picos populacionais de *S. paula* e *M. cavifrons* foram menores (2-3 insetos / armadilha) e menos frequentes em Wenceslau Braz (Figura 38), que está localizado na maior elevação (1750 m). Picos de final

de verão e outono (março-junho) (1-2 insetos / armadilha) foram observados para *D. costalimai*, a espécie mais frequente em Cabreúva, localidade de menor altitude (883 m) (Figura 41). Nesse local, um único pico (2,5 insetos / armadilha) da espécie *D. flavopicta* foi observado em janeiro de 2017.

Houve correlação positiva significativa entre o número médio de cigarrinhas capturadas por armadilha e a temperatura média mensal para *M. cavifrons* em Wenceslau Braz, São Bento do Sapucaí e Maria da Fé (Tabela 2). Os dados de captura de *S. paula* apresentaram correlação positiva significativa com temperatura média mensal em Wenceslau Braz, São Bento do Sapucaí e Maria da Fé, e com umidade relativa média mensal em S. Bento do Sapucaí. Em Wenceslau Braz, a captura da espécie *P. luteomaculata* também apresentou correlação positiva significativa com temperatura da espécie *Clastoptera* sp.1 apresentou correlação positiva com a temperatura apenas em Maria da Fé. Em Cabreúva, a espécie *D. flavopicta* apresentou correlação positiva significativa com a temperatura 2).

Com relação à umidade relativa mensal, apenas as espécie *S. paula* e *E. phoenicea* apresentaram correlação positiva significativa com esta variável climática em São Bento do Sapucaí e Maria da Fé, respetivamente. Além disso, *E. phoenicea* também apresentou correlação positiva significativa com a temperatura (Tabela 2). Não foi possível obter dados de umidade relativa dos pomares de Cabreúva e Wenceslau Braz.



Figura 38. Flutuação populacional de espécies predominantes de cigarrinhas em pomar de oliveira em Wenceslau Braz (MG), coletadas com cartão adesivo amarelo, no período de junho de 2015 a junho de 2020, em relação à temperatura média mensal.



Figura 39. Flutuação populacional de espécies predominantes de cigarrinhas em pomar de oliveira em São Bento do Sapucaí (SP), coletadas com cartão adesivo amarelo, no período de junho de 2015 a junho 2020, em relação à temperatura média mensal e umidade relativa média mensal.



Figura 40. Flutuação populacional de espécies predominantes de cigarrinhas em pomar de oliveira em Maria da Fé (MG), coletadas com cartão adesivo amarelo, no período de junho de 2015 a junho de 2020, em relação à temperatura média mensal e umidade relativa média mensal.



Figura 41. Flutuação populacional de espécies predominantes de cigarrinhas em pomar de oliveira em Cabreúva (SP), coletadas com cartão adesivo amarelo, no período de junho de 2015 a junho de 2020, em relação à temperatura média mensal.

Tabela 2. Coeficientes de correlação de Spearman (rs) entre variáveis climáticas (Tm: temperatura média mensal e URm: umidade relativa mensal) e o número médio mensal de cigarrinhas capturadas por armadilha adesiva amarela, no período de junho de 2015 a junho de 2020, em pomares de oliveira localizados em municípios da região da Serra da Mantiqueira, no sudeste do Brasil

	WB ^a		SB ^a			\mathbf{MF}^{a}			CB ^a			
Espécie	Т	ſm	Т	m	UI	Rm	Т	m	UI	Rm	Т	m
	rs	Р	rs	Р	rs	Р	rs	Р	rs	Р	rs	Р
Cercopidae											-	-
Deois flavopicta	-	_c	-	-	-	-	-	-	-	-	0,35*	0,016
Clastopteridae												
Clastoptera sp. 1	0,14	0,267	0,20	0,119	0,15	0,254	0,34*	0,007	0,01	0,929	-	-
Cicadellidae, Cicadellinae, Cicadellini												
Dilobopterus costalimai	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,07	0,609
Erythrogonia phoenicea	-	-	-	-	-	-	0,63*	0,000	0,40*	0,001	-	-
Macugonalia cavifrons	0,40*	0,002	0,46*	0,000	0,21	0,112	0,53*	0,014	-0,14	0,293	-	-
Paratubana luteomaculata	0,52*	0,015	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Scopogonalia paula	0,32*	0,012	0,42*	0,001	0,42*	0,001	0,32*	0,01	-0,10	0,453	-	-

^aMunícipios nos estados de Minas Gerais (MG) e São Paulo (SP), Brasil. WB: Wenceslau Braz/ MG; SB: São Bento do Sapucaí/SP; MF: Maria da Fé/MG; CB: Cabreúva/SP.*Correlação significativa quando valor de P < 0.05.

3.3.2. Infectividade natural por Xylella fastidiosa

Entre as espécies de cigarrinhas coletadas por cartões adesivos amarelos, foram positivas para *X. fastidiosa* por qPCR: *A. sapucaienses, Clastoptera* sp. 1, *E. phoenicea, M. cavifrons, P. luteomaculata, S. paula* e *O. facialis* (Tabela 3). Já para as cigarrinhas coletadas com rede de varredura na vegetação de cobertura do pomar, foram positivas por qPCR as espécies: *E. phoenicea, E. sinvali, H. similis, M. geographica, O. triplehorni, S. bimaculata* e *S. punctatissima*. Apenas *Clastoptera* sp. 1 foi positiva para *X. fastidiosa* entre as espécies coletadas com rede de varredura na copa de oliveiras, em 16,7 % das amostras (Tabela 4).

Não houve diferença estatística nos valores de infectividade obtidos para cigarrinhas coletadas por cartões adesivos amarelos. Para as espécies que foram coletadas com rede de varredura (vegetação rasteira e copa), não foi possível realizar inferência estatística devido ao baixo número de amostras avaliadas para algumas espécies e baixa frequência de amostras positivas para *X. fastidiosa*.

Família	Localização d		
Espécie	SB	MF	Total (%)
Cercopidae			
Sphenorhina rubra	_b	$0/19^{c}(0,0)^{d}$	0/19 (0,0)
Clastopteridae			
Clastoptera sp. 1	6/54 (11,1)	0/4 (0,0)	6/58 (10,3)
Cicadellidae, Cicadellinae, Cicadellini			
Amblyscartidia pardaliota	0/13 (0,0)	-	0/13 (0,0)
Amblyscartidia sapucaienses	4/75 (5,3)	-	4/75 (5,3)
Bucephalogonia xanthophis	0/9 (0,0)	0/37 (0,0)	0/46 (0,0)
Erythrogonia phoenicea	-	2/26 (7,7)	2/26 (7,7)
Erythrogonia sinvali	-	0/16 (0,0)	0/16 (0,0)
Macugonalia cavifrons	1/34 (2,9)	3/29 (10,3)	4/63 (6,4)
Paratubana luteomaculata	2/34 (5,9)	-	2/34 (5,9)
Scopogonalia paula	3/33 (9,1)	3/21 (14, 3)	6/54 (11,1)
Subrasaca bimaculata	0/10 (0,0)	-	0/10 (0,0)
Cicadellidae, Cicadellinae, Proconiini			
Oncometopia facialis	1/3 (33,3)	0/25 (0,0)	1/28 (3,6)
Total (%)	17/265 (6,4)	8/177 (4,5)	25/442 (5,6)

Tabela 3. Frequência de detecção de *Xylella fastidiosa* por PCR em tempo real (qPCR) em espécies de Auchenorrhyncha coletadas com cartões adesivos amarelos em olivais no sudeste do Brasil

^aMunícipios nos estados de Minhas Gerais (MG) e São Paulo (SP), Brasil. SB: São Bento do Sapucaí/SP; MF: Maria da Fé/MG. ^bNão testado. ^cNúmero de amostras positivas para *X*. *fastidiosa* sobre o número total de amostras testadas por qPCR. Cada amostra consiste de três indivíduos, considerando-se positivas aquelas com CT (*cycle threshold*) \leq 36. ^dPorcentagem de infectividade. *Não houve diferença estatística entre os percentuais de infectividade natural das diferentes espécies de cigarrinhas, pelo teste estatístico de modelo linear generalizado (*P* < 0,05).

Família	Vegetação d	le cobertura	Copa da		
Espécie	SB ^a	MF	SB	MF	Total (%)
Cercopidae					
Deois flavopicta	_ ^b	$0/3^{c}(0,0)^{d}$	-	-	0/3(0,0)
Deois schach	-	0/1(0,0)	-	-	0/1 (0,0)
Notozulia entreriana	-	0/3 (0,0)	-	-	0/3 (0,0)
Sphenorhina rubra	-	0/3 (0,0)	-	-	0/3 (0,0)
Clastopteridae					
Clastoptera sp. 1	0/1 (0,0)	-	1/3 (33,3)	0/2 (0,0)	1/6 (16,7)
Cicadellidae, Cicadellinae, Cicadellini					
Bucephalogonia xanthophis	-	0/3 (0,0)	-	-	0/3 (0,0)
Diedrocephala bimaculata	0/2 (0,0)	0/3 (0,0)	-	-	0/5 (0,0)
Erythrogonia hertha	-	0/6 (0,0)	-	-	0/6 (0,0)
Erythrogonia phoenicea	-	1/9 (11,1)	-	-	1/9 (11,1)
Erythrogonia sinvali	-	1/9 (11,1)	-	0/1 (0,0)	1/10 (10,0)
Ferrariana trivitatta	0/4 (0,0)	0/40 (0,0)	-	-	0/45 (0,0)
Hortensia similis	1/4 (25,0)	5/43 (11,6)	-	0/1 (0,0)	6/48 (12,5)
Macugonalia cavifrons	0/2 (0,0)	0/2 (0,0)	0/1 (0,0)	-	0/5 (0)
Macugonalia geographica	-	1/2 (50,0)	-	-	1/2 (50,0)
Oragua triplehorni	0/1 (0,0)	1/5 (20,0)	-	-	1/6 (16,6)
Paratubana luteomaculata	0/1 (0,0)	-	-	-	0/1 (0,0)
Plesiommata mollicella	0/1 (0,0)	0/3 (0,0)	-	-	0/4 (0,0)
Scopogonalia paula	-	0/4 (0,0)	-	-	0/4 (0,0)
Scoposcartula tobiasi	-	0/1 (0,0)	-	-	0/1 (0,0)
Selvitsa humeralis	-	0/1 (0,0)	-	-	0/1 (0,0)
Sibovia sagata	0/3 (0,0)	0/6 (0,0)	-	-	0/9 (0,0)
Sonesimia grossa	0/5 (0,0)	0/6 (0,0)	-	-	0/11 (0,0)
Subrasaca bimaculata	1/2 (50,0)	-	-	-	1/2 (50,0)
Syncharina punctatissima	3/7 (42,9)	0/6 (0,0)	-	-	3/13 (23,1)
Total (%)	5/34 (14,7)	9/159 (5,7)	1/4 (25,0)	0/4 (0,0)	15/202 (7,4)

Tabela 4. Frequência de detecção de *Xylella fastidiosa* por PCR em tempo real (qPCR) em espécies de Auchenorrhyncha coletadas com rede de varredura na vegetação de cobertura e na copa de oliveiras em olivais no sudeste do Brasil

^aMunícipios nos estados de Minhas Gerais (MG) e São Paulo (SP), Brasil. SB: São Bento do Sapucaí/SP; MF: Maria da Fé/MG. ^bNão testado. ^cNúmero de amostras positivas para *X. fastidiosa* sobre o número total de amostras testadas por qPCR. Cada amostra consiste de três indivíduos, considerando-se positivas aquelas com CT (*cycle threshold*) \leq 36. ^dPercentual de infectividade. *Não houve diferença estatística entre os percentuais de infectividade natural das diferentes espécies de cigarrinhas, pelo teste estatístico de modelo linear generalizado binomial (*P* < 0,05).

3.4. Discussão

Esse é o primeiro estudo de flutuação populacional de cigarrinhas em pomares de oliveira na Serra da Mantiqueira. Os resultados obtidos por meio das amostragens com cartões adesivos amarelos em olivais de diferentes localidades e altitudes nessa região mostraram o mesmo padrão da ocorrência de picos populacionais nos meses mais quentes e úmidos e decréscimo nos meses mais frios e secos do ano, relatado para espécies de cigarrinhas da subfamília Cicadellinae vetoras de *X. fastidiosa* em outras culturas como citros, videira, café e ameixeira (Yamamoto et al. 2001; Lovato et al. 2001; Yamamoto et al. 2002; Müller 2008; Peruzo et al. 2013; Molina et al. 2016; Schneider et al. 2016; Feitosa 2017). Um padrão distinto foi observado para *Clastoptera* sp. 1, representante da família Clastopteridae (Cercopoidea), que apresentou picos populacionais durante o final do verão e começo do outono, quando as temperaturas já estão um pouco mais amenas e a umidade relativa do ar um pouco mais baixa. Em um estudo realizado no México, outra espécie de Clastopteridae (*Clastoptera laneata* Fowler) apresentou picos populacionais em tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) nos meses do verão (Lópes et al. 2013), indicando que há diferenças ecológicas entre espécies de um mesmo grupo taxonômico.

Nos estudos realizados em olivais europeus, onde a bactéria é disseminada principalmente por uma espécie de Aphrophoridae (Cercopoidea), *Philaenus spumarius* (Linnaeus, 1758), não relatada no Brasil, de acordo com o Catálogo Taxonômico da fauna do Brasil (<http://fauna.jbrj.gov.br/>), foram relatados picos populacionais nos meses do verão (Ben Moussa et al. 2016; Bodino et al. 2019), ou durante a primavera (Tsagkarakis et al. 2018). As diferenças em flutuação populacional entre espécies de cigarrinhas evidenciam a importância de se avaliar os diferentes grupos taxonômicos de vetores, como também, a região onde a cultura estuda está inserida. Diferenças no hábito de vida das espécies vetoras podem influenciar na tomada de decisão sobre quais métodos adotar para o controle do inseto.

Outro fator a ser considerado em estudos de flutuação populacional de espécies de insetos é a altitude do pomar, que influencia em muitos aspectos, principalmente climáticos, e que determina, consequentemente, a composição da paisagem natural. Sabe-se que muitas espécies de cigarrinhas são polífagas, podendo se reproduzir e/ou se alimentar em uma grande diversidade de espécies vegetais (Redak et al. 2004). Sendo assim, quanto maior for a diversidade de vegetação da região, maior será a disponibilidade de plantas hospedeiras e a diversidade e abundância das espécies de insetos herbívoros (Silveira Neto et al. 1976). Portanto, diferenças em época e tamanho dos picos populacionais de certas espécies de

cigarrinhas podem ocorrer em diferentes altitudes, bem como ao longo dos anos de amostragens.

Para estudos de disseminação de *X. fastidiosa* é importante avaliar se as espécies consideradas possíveis vetoras estão infectivas naturalmente no campo. Nesse trabalho verificou-se uma taxa de infectividade natural geral (percentual de todas as amostras de cigarrinhas que foram positivas para o patógeno por qPCR) de 5,6% em amostras de cigarrinhas coletadas por cartões adesivos amarelos e de 7,4% para as amostras coletadas com rede de varredura. Esses valores são inferiores ao que foi relatado em cigarrinhas coletadas em cafeeiro (*Coffea arabica* L.) (30,4%) (Silva et al. 2007), porém são próximos ao encontrado para cigarrinhas coletadas em pomares de citros (*Citrus sinensis* L. Osbeck) (média de 4,2%) (Pereira 2000). Em olivais no sul da Itália, a infectividade natural de *P. spumarius* variou de 26 a 71% dos indivíduos para *X. fastidiosa* (Cornara et al. 2016). Essas diferenças de valores encontrados devem-se, provavelmente, aos fatores que envolvem a relação da bactéria com o inseto vetor e a planta-fonte de inóculo da bactéria, já relatados em outros estudos (Almeida 2001; Redak et al. 2004; Daugherty e Almeida 2009; Lopes et al. 2009; Daugherty et al. 2010; Daugherty et al. 2011; Rashed et al. 2011), além de aspectos ambientais (Baldi e La Porta 2017, Bodino et al. 2021).

Com base nos dados obtidos pelas análises flutuação populacional e infectividade natural, pode-se inferir que *Clastoptera* sp.1, *M. cavifrons* e *S. paula* são cigarrinhas relevantes no patossistema da SDFO na região da Serra da Mantiqueira, por apresentarem picos populacionais expressivos (>3 indivíduos/armadilha adesiva amarela) em diferentes localidades, pelo hábito de alimentação na seiva do xilema de plantas e por apresentarem indivíduos naturalmente infectivos por *X. fastidiosa*. A captura de indivíduos com rede varredura na copa das oliveiras evidencia que tais espécies visitam naturalmente a planta de oliveira. onde possivelmente se alimentam, podendo adquirir *X. fastidiosa* em uma árvore infectada e transmitir para outras árvores sadias no pomar, se confirmados como vetores em oliveira.

Um resultado muito interessante desse trabalho foi a detecção de *X. fastidiosa* em amostras de *Clastoptera* sp. 1 coletadas por rede de varredura na copa das oliveiras, onde são observadas ninfas dessa espécie se desenvolvendo nas brotações, além de adultos em pouso (Froza 2017), evidenciando que a oliveira é uma planta hospedeira dessa espécie de cigarrinha. Com a comprovação de que *Clastoptera* sp. 1 é capaz de carregar naturalmente a bactéria, mostra-se evidente a necessidade de mais estudos ecológicos e taxonômicos sobre essa espécie e seu provável envolvimento com a disseminação da doença em olivais.

Verificaram-se, também, as épocas do ano de maior ocorrência em olivais de espécies predominantes de cigarrinhas, que foram estações da primavera, do verão e o início do outono. Esta informação sugere que o período de maior risco de propagação de *X. fastidiosa* por vetores na região da Serra da Mantiqueira esteja compreendido entre os meses mais quentes e úmidos do ano (primavera, verão e início do outono), época em que medidas de manejo devem ser intensificadas para prevenir a infecção de oliveiras pelo patógeno, de modo semelhante ao que se recomenda para o manejo da clorose variegada dos citros, doença também causada por *X. fastidiosa* (Lopes e Krugner 2016).

As informações de flutuação populacional e de infectividade natural relatadas neste trabalho auxiliam na avaliação do papel de diferentes espécies de cigarrinhas na disseminação de *X. fastidiosa* em olivais na região da Serra da Mantiqueira e arredores. Essas informações são essenciais para o desenvolvimento de estratégias e métodos mais adequados para o manejo de insetos vetores, de modo a controlar o avanço da SDFO em olivais dessa região produtora.

3.1. Conclusões

- Os meses de primavera, verão e início de outono constituem o período de maior ocorrência de espécies de cigarrinhas predominantes em olivais nos Estados de São Paulo e Minas Gerais;

- *Clastoptera* sp. 1, *M. cavifrons* e *S. paula* são as espécies com maiores densidades populacionais em olivais na região da Serra da Mantiqueira, com base em captura por armadilhas adesivas amarelas;

- As espécies de cigarrinhas A. sapucaienses, Clastoptera sp. 1, E. phoenicea, E. sinvali, M. cavifrons, H. similis, M. geographica, O. facialis, O. triplehorni P. luteomaculata, S. bimaculata, S. paula e S. punctatissima carregam naturalmente a bactéria X. fastidiosa em olivais dessa região.

Referências

- Almeida RPP, Pereira EF, Purcell AH, Lopes JRS (2001) Multiplication and movement of a citrus strain of *Xylella fastidiosa* within sweet orange. Plant Dis 85(45):382–382. https://doi.org/10.1094/PDIS.2001.85.4.382
- Baldi P, La Porta N (2017) *Xylella fastidiosa*: Host range and advance in molecular identification techniques. Front Plant Sci 8:1–22. https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00944

- Beal DJ, Cooper M, Daugherty MP, Purcell AH, Almeida RPP (2021) Seasonal abundance and infectivity of *Philaenus spumarius* (Hemiptera: Aphrophoridae), a vector of *Xylella*
- *fastidiosa* in California vineyards. Environm Entomol 50(2):467–476. https://doi.org/10.1093/ee/nvaa178
- Ben Moussa IE, Mazzoni V, Valentini F, Yaseen T, Lorusso D, Speranza S, Digiaro M, Varvaro L, Krugner R, D'Onghia AM (2016) Seasonal fluctuations of sap-feeding insect species infected by Xylella fastidiosa in Apulian olive groves of southern Italy. J Econ Entomol 109:1512–1518. https://doi.org/10.1093/jee/tow123
- Bodino N, Cavalieri V, Dongiovanni C, Plazio E, Saladini MA, Volani S, Simonetto A, Fumarola G, Di Carolo M, Porcelli F, Gilioli G, Bosco D (2019) Phenology, seasonal abundance and stage-structure of spittlebug (Hemiptera: Aphrophoridae) populations in olive groves in Italy. Sci Rep 9:17725. https://doi.org/10.1038/s41598-019-54279-8
- Bodino N, Cavalieri V, Pegoraro M, Altamura G, Canuto F, Zicca S, Fumarola G, Almeida RPP, Saponari M, Dongiovanni C, Bosco D (2021) Temporal dynamics of the transmission of *Xylella fastidiosa* subsp. *pauca* by *Philaenus spumarius* to olive plants. Entomol Generalis, 41(5):463–480. https://doi.org/10.1127/entomologia/2021/1294
- Carvalho IGB, Esteves MB, Froza JA, Kleina HT, Souza-Neto RR, Souza AA, Coletta-Filho HD (2022) Doenças associadas à *Xylella fastidiosa* no Brasil. RAPP 28:50–68. https://doi.org/ 10.31976/0104-038321v280003
- Coletta-Filho HD, Francisco CS, Lopes JRS, De Oliveira AF, Da Silva LFO (2016) First report of olive leaf scorch in Brazil, associated with *Xylella fastidiosa* subsp. *pauca*. Phytopathol Mediterr 55(1):3–8. https://doi.org/10.14601/Phytopathol_Mediterr-17259
- Cornara D, Cavalieri V, Dongiovanni C, Altamura G, Palmisano F, Bosco D, Porcelli F, Almeida RPP, Saponari M (2016) Transmission of *Xylella fastidiosa* by naturally infected *Philaenus spumarius* (Hemiptera, Aphrophoridae) to diferente host plants, J Appl Entomol 141(1-2):80–87. https://doi.org/10.1111/jen.12365
- Cornara D, Morente M, Markheiser A, Bodino N, Tsai CW, Fereres A, Redak RA, Perring T, Lopes JRS (2019) An overview on the worldwide vectors of *Xylella fastidiosa*. Entomol Generalis. https://doi.org/10.1127/entomologia/2019/0811
- Daugherty MP, Almeida RPP (2009) Estimating Xylella fastidiosa transmission parameters: decoupling sharpshooter number and feeding period. Entomol Experiment appl 132:84– 92. https://doi.org/10.1111/j.1570-7458.2009.00868.x

- Daugherty MP, Lopes JRS, Almeida RPP (2010) Vector within-host feeding preference mediates transmission of a heterogeneously distributed pathogen. Ecol Entomol 35:360– 66. https://doi.org/10.1111/j.1365-2311.2010.01189.x
- Daugherty MP, Rashed A, Almeida RPP, Perring TM (2011) Vector preference for hosts differing in infection status: Sharpshooter movement and Xylella fastidiosa transmission. Ecol Entomol 36(5):654–662. https://doi.org/10.1111/j.1365-2311.2011.01309.x
- Daugherty MP, Almeida RPP (2019) Understanding how an invasive vector drives Pierces' disease epidemics: seasonality and vine-to-vine spread. Phytopathol 109:277–285. https://doi.org/10.1094/PHYTO-07-18-0217-FI
- Dietrich CH (2005) Keys to the families of Cicadomorpha and subfamilies and tribes of Cicadellidae (Hemiptera: Auchenorrhyncha). Flor Entomol 88(4):502–517. https://doi.org/10.1653/0015-4040(2005)88[502:KTTFOC]2.0.CO;2
- Fadel AL, Sanches ES, Carvalho SA, Federici MT, Coletta-Filho HD (2014) Navelina ISA 315: A cultivar resistant to citrus variegated chlorosis. Crop Protect 64:115–121. https://doi.org/10.1016/j.cropro.2014.06.014
- Feitosa MCB (2017) Comunidade e dinâmica populacional de cigarrinhas (Hemiptera: Cicadellidae: Cicadellinae) e seus parasitoides de ovos (Hymenoptera: Chalcidoidea) em pomares cítricos no Amazonas, Brasil. Tese, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia
- Froza JA (2017) Levantamento de espécies de cigarrinhas (Hemiptera: Auchenorrhyncha) com ênfase em possíveis espécies vetoras de *Xylella fastidiosa* em pomares de oliveira na Serra da Mantiqueira. Dissertação, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo
- Gruber BR, Daugherty MP (2013) Understanding the effects of multiple sources of seasonality on the risk of pathogen spread to vineyards: vector pressure, natural infectivity, and host recovery. Plant Pathol 62:194–204. https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2012.02611.x
- Hothorn T, Bretz F, Westfall P (2008) Simultaneous inference in general parametric models. Biometric J 50(3):346–363. https://doi.org/10.1002/bimj.200810425
- Lopes JRS (1996) Mecanismos de Transmissão de *Xylella fastidiosa* por Cigarrinha. Laranja 17:79–92
- Lopes JRS, Daugherty MP, Almeida RPP (2009) Context-dependent transmission of a generalist plant pathogen: host species and pathogen strain mediate insect vector competence. Entomol Experiment Appl 131: 216–224. https://doi.org/10.1111/j.1570-7458.2009.00847.x

- López VG, Soto SS, Martínez NB, La Cruz MP, Hernández JHRM (2013) Fluctuación poblacional de *Clastoptera laneata* (Hemiptera: Clastopteridae) en el cultivo del cacao en Tabasco, México. Fitosanidad 17(3):131–137
- Lopes JRS, Krugner R (2016) Transmission ecology and epidemiology of the citrus variegated chlorosis strain of *Xylella fastidiosa*. In: Brown JK (ed) Vector-mediated transmission of plant pathogens. American Phytopathological Society Press, Saint Paul, pp 195–208
- Molina RO, Santos KS, Gonçalvez ACA, Nunes WMC (2016) Distribuição espaço-temporal de cigarrinhas (Hemiptera: Cicadellidae) vetoras de *Xylella fastidiosa* em pomares cítricos. Rev Agro@mbiente on-line 10(2):145–152
- Moral RA, Hinde J, Demétrio CGB (2017) Half-normal plots and overdispersed models in R: the hnp package. J Statistic Soft 81(10): 1–23. https://doi.org/10.18637/jss.v081.i10
- Müller C (2008) Análise faunística e flutuação populacional de cigarrinhas (Hemiptera: Cicadellidae) potenciais vetoras de *Xylella fastidiosa* em pomares de ameixeira nos estados do Rio Grande do Sul e São Paulo. Dissertação, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo
- Oliveira AC, Vallim MA, Semighini CP, Araújo WL, Goldman GH, Machado MA (2002) Quantification of *Xylella fastidiosa* from citrus trees by real-time polymerase chain reaction assay. Phytopathol 92(10):1048–1054. https://doi.org/10.1094/PHYTO.2002.92.10.1048
- Pereira EF (2000) Estudos de fatores sazonais relacionados à transmissão de *Xylella fastidiosa* em pomares de citros. Dissertação, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo
- Peruzo L, Paris P, Poletto G, Ferri T, Botton M, Azevedo-Filho WS (2013) Análise faunística e flutuação populacional de cigarrinhas (Cicadellidae: Cicadellinae) potenciais vetoras de *Xylella fastidiosa* associadas à cultura da videira nos munícipios de Bento Gonçalves e Pinto Bandeira, RS. Caderno de pesquisa série Biologia 25(3):27–39
- R Core Team (2021) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. https://www.R-project.org/
- Rashed A, Killiny N, Kwan J, Almeida RPP (2011) Background matching behavior and pathogen acquisition: plant site preference does not predict the bacterial acquisition efficiency of vectors. Arthropod-Plant Interact 5:97–106. https://doi.org/10.1007/s11829-010-9118-z

- Redak RA, Purcell AH, Lopes JRS, Blua MJ, Mizell RF, Andersen PC (2004) The biology of xylem fluid-feeding insect vectors of *Xylella fastidiosa* and their relation to disease epidemiology. Ann Rev Entomol 49:243–270. https://doi.org/10.1146/annurev.ento.49.061802.123403
- Roberto SR, Coutinho A, Lima JEO, Miranda VS, Carlos EF (1996) Transmissão de *Xylella* fastidiosa pelas cigarrinhas Dilobopterus costalimai, Acrogonia terminalis e Oncometopia facialis em citros. Fitopatol Bras 21(4):517–518
- Roberto SR, Yamamoto PT (1998) Flutuação populacional e controle químico de cigarrinhas em citros. Laranja 19:269–284
- Rogers SO, Bendich AJ (1998) Extraction of DNA from plant tissues. In: Gelvin SB, Schilperoort (eds) Plant molecular biology manual, Kluwer Academic Publishers, Boston, pp 73–83
- Schneider NA, Azevedo-Filho WS, Müller C, Lopes JRS, Botton M (2016) Flutuação populacional e análise faunística de cigarrinhas (Cicadellidae) em pomar de ameixeira em Paranapanema, São Paulo, Brasil. Rev Interdiscip Ciênc Apl 1(1)
- Silva MRL, Meneguim AM, Paião FG, Meneguim L, Canteri MG, Leite Jr RP (2007) Infectividade natural por *Xylella fastidiosa* Wells *et al.* De cicadelíneos (Hemiptera: Cicadellidae) em lavouras cafeeiras do Paraná. Neotrop Entomol 36(2):274–281. https://doi.org/10.1590/S1519-566X2007000200015
- Silveira Neto S, Nakano O, Bardin D, Villa Nova NA (1976) Manual de ecologia dos insetos. Agronômica Ceres, Piracicaba
- Sisterson MS, Burbank L, Krugner R, Haviland D, Stenger DC (2020) *Xylella fastidiosa* and glass-winged sharpshooter population dynamics in the southern San Joaquin Valley of California. Plant dis 104:2994–3001. https://doi.org/10.1094/PDIS-01-20-0066-RE
- Tsagkarakis AE, Afentoulis DG, Matared M, Thanou ZN, Stamatakou GD, Kalaitzaki AP, Tzobanoglou DK, Goumas D, Trantas E, Zarboutis I, Perdikis DC (2018) Identification and seasonal abundance of Auchenorrhyncha with a focus on potential insect vectors of *Xylella fastidiosa* in olive orchards in three regions of Greece. J Econ Entomol 111(6):2536–2545. https://doi.org/10.1093/jee/toy239
- Yamamoto PT, Pria Júnior WD, Roberto SR, Felippe MR, Freitas EP (2001) Flutuação populacional de cigarrinhas (Hemiptera: Cicadellidae) em pomar cítrico em formação. Neotrop Entomol 30(1): 175–177. https://doi.org/10.1590/S1519-566X2001000100027

- Yamamoto PT, Roberto SR, Pria Júnior WD, Felippe MR, Freitas EP (2002) Espécies e flutuação populacional de cigarrinhas em viveiro de citros, no município de Mogi Guaçu-SP. Rev Bras Frutic 2(41):389–394. https://doi.org/10.1590/S0100-2945200200020023
- Young DA (1968) Taxonomic study of the Cicadellinae (Homoptera: Cicadellidae). Part 1. Proconiini. Bull US Nat Mus 261:1–287. https://doi.org/10.5479/si.03629236.261.1
- Young DA (1977) Taxonomic study of the Cicadellinae (Homoptera: Cicadellidae). Part 2. New World Cicadellini and the genus *Cicadella*. Tech Bull N Carol Agric Exp Stn 239:1– 1135

4. TRANSMISSÃO DE *Xylella fastidiosa* subsp. *pauca* PARA OLIVEIRA POR CIGARRINHAS EM POMARES DO SUDESTE BRASILEIRO

Resumo

Xylella fastidiosa subsp. pauca foi isolada de olivais com síndrome de dessecação foliar da oliveira (SDFO) no Brasil, mas os insetos vetores são desconhecidos. Em outras culturas, essa bactéria é transmitida por cigarrinhas que alimentam na seiva do xilema, nas superfamílias Membracoidea (Cicadellinae) e Cercopoidea. Neste trabalho avaliou-se a capacidade de transmissão de X. fastidiosa por cicadelíneos e cercopídeos comuns em olivais da Serra da Mantiqueira, Sudeste do Brasil. Adultos de cada espécie foram primeiramente pré-testados para infectividade natural em plântulas sadias de Catharanthus roseus durante um período de acesso à inoculação (PAI) de 12 h. Os insetos foram então confinados em oliveiras infectadas com X. fastidiosa subsp. pauca (ST 16) por um período de acesso de aquisição de 24 h, seguido de um PAI de 24 h em oliveiras sadias (plantas-teste). Com base na detecção de X. fastidiosa por qPCR em plantas-teste após 12 meses da inoculação, verifou-se a transmissão por 11 espécies de cicadelíneos, Erythrogonia hertha, E. phoenicea, E. sinvali, Macugonalia cavifrons, M. leucomelas, Oragua triplehorni, Plesiommata mollicella, Scopogonalia paula, Sibovia sagata, Sonesimia grossa e Syncharina punctatissima, e por três cercopídeos, Deois schach, Notozulia entreriana e Sphenorhina rubra. As taxas de transmissão por indivíduo variaram de 0,4 a 12,9%, e as taxas de sobrevivência em oliveira variaram de 33,3 a 100%, dependendo da espécie.

Palavras-chave: Olea europea L.; Bactéria fitopatogênica; Gama de vetores, Cicadellini

Abstract

Xylella fastidiosa subsp. pauca was isolated from olive trees with olive leaf desiccation syndrome (OLDS) in Brazil, but the vectors are unknown. In other crops, this bacterium is transmitted by xylem-sap feeding sharpshooters (Cicadellinae) and spittlebugs (Cercopoidea). This study was aimed at evaluating the X. fastidiosa transmission ability of sharpshooters and spittlebugs common in olive orchards of the Mantiqueira Mountain Range Region, Southeastern Brazil. Adults of 16 species were first pretested for natural infectivity on healthy seedlings of *Catharanthus roseus* for a 12-h inoculation access period (IAP). The insects were then confined on olive trees infected with X. fastidiosa subsp. pauca (ST 16) for a 24-h acquisition access period, followed by a 24-h IAP on healthy olive trees (test plants). Based on X. fastidiosa detection by qPCR in test plants at 12 months after inoculation, transmission was verified for 11 sharpshooters, Erythrogonia hertha, E. phoenicea, E. sinvali, Macugonalia cavifrons, M. leucomelas, Oragua triplehorni, Plesiommata mollicella, Scopogonalia paula, Sibovia sagata, Sonesimia grossa e Syncharina punctatissima, and three spittlebugs, Deois schach, Notozulia entreriana e Sphenorhina rubra. Transmission rates by individuals varied from 0.4 to 12.9%, and survival rate on olives were 33.3-100%.

Keywords: Olea europea L.; Phytopathogenic bacterium; Vector range, Cicadellini

4.1. Introdução

Xylella fastidiosa Wells et al. é uma bactéria fitopatogênica do tipo Gram-negativa que coloniza os vasos xilemáticos das plantas, causando doenças em frutíferas de grande importância econômica (Hopkins 1989). *X. fastidiosa* apresenta cinco subespécies descritas, sendo três consideradas principais (*fastidiosa*, *pauca* e *multiplex*) (Almeida e Nunney 2015; Vanhove et al. 2019). O Brasil são encontradas apenas as subespécies *multiplex* e *pauca* (Carvalho et al. 2022).

A bactéria é disseminada, naturalmente, por cigarrinhas da subfamília Cicadellinae e da superfamília Cercopoidea (Hemiptera: Auchenorrhyncha), pelo fato de apresentarem o hábito alimentar de sugar a seiva dos vasos de xilema das plantas (Purcell e Finlay 1979; Redak et al. 2004; Cornara et al. 2019; Cornara et al. 2020). A transmissão da bactéria pelas cigarrinhas é um processo complexo, devido a diversos fatores relacionados à planta hospedeira, vetor e bactéria, sob influência de variáveis ambientais (Almeida et al. 2001; Redak et al. 2004; Daugherty e Almeida 2009; Lopes et al. 2009; Daugherty et al. 2010; Daugherty et al. 2011; Rodino et al. 2021).

No Brasil, *X. fastidiosa* causa doenças em citros (*Citrus sinensis* L. Osbeck), ameixeira (*Prunus salicina* Lindl.) e cafeeiro (*Coffea arabica* L.) (Carvalho e Souza 1991; Chang et al. 1993; Paradella Filho et al. 1995). Mais recentemente, estirpes de *X. fastidiosa* subsp. *pauca* foram detectadas em diversos pomares de oliveira (*Olea europaea* L) na região da Serra da Mantiqueira (Coletta-Filho et al. 2016, Safady et al. 2019), em associação com sintomas de uma nova enfermidade denominada síndrome do dessecamento foliar da oliveira (SDFO) (Carvalho et al. 2022). A doença pode ser reconhecida no campo pela presença de folhas expressando diferentes graus de queima, que se inicia na parte apical do limbo foliar e geralmente na extremidade dos ramos; pode ocorrer desfolha parcial, mas as folhas dessecadas geralmente permanecem aderidas aos ramos. Com a evolução da doença ocorre morte de brotos e ramos, observando-se ramos ou setores da copa inteiramente dessecados, culminando com morte da planta (Coletta-Filho et al. 2016, Carvalho et al. 2022). Uma doença semelhante foi relatada em oliveira na Itália (Saponari et al. 2013) e na Argentina (Haelterman et al. 2015), e vem causando grandes preocupações e prejuízos na Europa (Saponari et al. 2019)

Quando X. *fastidiosa* acomete uma nova cultura agrícola ou uma nova região de cultivo, há a necessidade de se estudar os elementos que compõem o patossistema da doença, principalmente os possíveis vetores e o seu papel na disseminação do patógeno. Na Itália,

onde a doença foi descrita há mais tempo (Saponari et al. 2013), espécies de Cercopoidea que sugam vasos de xilema de plantas, tais como *Neophilaenus campestris* (Fallén, 1805) e *Philaenus spumarius* (Linnaeus, 1758) (Hemiptera: Aphrophoridae) já foram identificadas como vetores da bactéria em oliveira (Elbeaino et al. 2014), sendo *P. spumarius* considerada a espécie mais relevante pela sua maior abundância em olivais nas regiões afetadas da Europa (Cornara et al. 2019).

No Brasil, um estudo prévio indicou a existência de grande diversidade de espécies de Auchenorrhyncha em pomares de oliveira na região da Serra da Mantiqueira, com diversas espécies de Cicadellinae e Cercopoidea que são potenciais vetores do patógeno em oliveira naquela região (Froza, 2017). Na presente pesquisa, avaliou-se a capacidade de transmissão de uma estirpe de oliveira de *X. fastidiosa* subsp. *pauca* por 16 espécies de Cicadellini e quatro espécies de Cercopidae, para plantas de oliveira.

4.2. Material e métodos

4.2.1. Obtenção dos insetos

Para os ensaios de transmissão, foram selecionadas nove espécies consideradas predominantes em pomares de oliveira da Serra da Mantiqueira, com base em levantamento com armadilhas adesivas amarelas e análise faunística conduzidos previamente por Froza (2017), sendo sete da tribo Cicadellini - Bucephalogonia xanthophis (Berg, 1879), Erythrogonia phoenicea (Signoret, 1853), Erythrogonia sinvali Froza, Quintas & Mejdalani, 2021, Macugonalia cavifrons (Stål, 1862), Macugonalia leucomelas (Walker, 1851), Scopogonalia paula Young, 1977 e Sibovia sagata China, 1927; e duas da família Cercopidae - Deois flavopicta (Stål, 1854) e Sphenorhina rubra (Linnaeus, 1758). Também foram avaliadas duas espécies de Cicadellinae, Ferrariana trivitatta (Signoret, 1854) e Sonesimia grossa (Signoret, 1854), previamente relatadas como vetores de X. fastidiosa em citros (Lopes 1996; Roberto et al. 1996; Redak et al. 2004; Lopes e krugner 2016), além de outras espécies de cigarrinhas encontradas na vegetação espontânea de pomares de oliveira, incluindo sete da subfamília Cicadellinae - Erythrogonia hertha Medler, 1963, Hortensia similis (Walker, 1851), Macugonalia geographica (Signoret, 1855) Oragua triplehorni Young, 1977, Plesionmata mollicella (Fowler, 1900), Selvitsa humeralis (Signoret, 1853) e Syncharina punctatissima (Signoret, 1854); e duas da família Cercopidae - Deois schach (Fabricius, 1787) e Notozulia entreriana (Berg, 1879).
Adultos das referidas espécies de cigarrinhas foram coletados com rede de varredura na vegetação espontânea das entrelinhas de olivais localizados no Campo Experimental de Maria da Fé, da Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (CEMF/Epamig), no município de Maria da Fé (MG). No caso das espécies *B. xanthophis, M. cavifrons* e *S. sagata*, também foram utilizados adultos provenientes de colônias mantidas no Laboratório de Insetos Vetores de Fitopatógenos, no Departamento de Entomologia e Acarologia da Esalq/USP, conforme descrita por Esteves et al. (2019).

4.2.2. Obtenção de plantas

As plantas de oliveira infectadas por X. fastidiosa (plantas-fonte) foram obtidas por estaquia no CEMF/Epamig, a partir de ramos de O. europaea L. cv. Grappolo com sintomas de SDOF. O enraizamento das estacas seguindo método descrito por Oliveira et al. (2003) e Silva et al. (2012). Foram coletadas estacas semilenhosas da região mediana das oliveiras com aproximadamente 12 cm de comprimento, com quatro a seis internódios e com quatro folhas inteiras na região apical. Primeiramente, as estacas receberam um tratamento com solução AIB (ácido indoblutírico), na concentração de 3 g.L-1, imergindo 3 cm da base por 5 s. Posteriormente as estacas foram levadas á casa de vegetação com nebulização intermitente automatizada, acionada das 7 às 19 horas, em intervalos de 10 min, por 10 s, mantendo a umidade relativa em torno de 80% e temperatura entre 23 e 27°C. As estacas foram colocadas para enraizar em bancadas preenchidas com areia de textura média, com dimensões de 1 m de largura, 5 m de comprimento e 0,25 m de profundidade, no espaçamento de 3 cm na linha e 4 cm entre linhas. Após 70 dias de enraizamento, as estacas foram plantadas em saco plástico preto de 20 X 35 X 0,015 cm, contendo mistura de 1/2 solo de barranco, 1/4 de areia e 1/4 fertilizante orgânico composto (Provaso, Genfértil). A estirpe de X. fastidiosa subsp. pauca infectando as plantas-fonte foi identificada por tipagem de sequência multilocus (MLST) como ST (sequence type) 16, que é o genótipo predominante em oliveiras com SDFO na região da Serra da Mantiqueira (Coletta-Filho et al. 2016; Safady et al. 2019).

Como plantas-teste nos ensaios de transmissão para oliveira, utilizaram-se mudas sadias de *O. europea* cv. Koroneiki, obtidas por micropropragação, certificadas e livres de *X. fastidiosa*, provenientes da empresa Agromillora Produtos e Comércio de Mudas e Vegetais Ltda. Essas mudas também foram plantadas em sacos plásticos conforme já descrito para as plantas-fonte. Mudas de *Catharanthus roseus* obtidas a partir de sementes (*seedlings*) em vasos plásticos contendo substrato para plantas Tropstrato HT Hortaliças (Vida Verde), foram

usadas como planta pré-teste para avaliar a ocorrência de *X. fastidiosa* em insetos coletados no campo (infectividade natural), antes da aquisição da estirpe de *X. fastidiosa* subsp. *pauca* (ST16) em plantas-fonte. Todas as plantas foram mantidas em estufa com tela antiafídeos, onde receberam fertirrigação com macro e micronutrientes três vezes na semana, conforme descrito por Esteves et al. (2019).

4.2.3. Experimento de transmissão de X. fastidiosa subsp. pauca por cigarrinhas

Os adultos de cada espécie de cigarrinha coletados em campo foram incialmente submetidos a um pré-teste de infectividade natural, em que foram confinados em gaiolas do tipo "voal" sobre *seedlings* sadios de *C. roseus* durante um período de acesso a inoculação (PAI) de 12 h, em números de 10-20 insetos/seedling. Depois do pré-teste, as cigarrinhas foram confinadas em gaiolas de tecido do tipo "voil" sobre as plantas de oliveira infectadas com *X. fastidiosa* subsp. *pauca* ST 16 (plantas-fonte), por um período de acesso a aquisição (PAA) de 24 h. Após o PAA, os insetos foram segregados por espécie e submetidos a um PAI de 24 h em mudas sadias de oliveira (plantas-teste), em números de 3-10 insetos/planta-teste, sendo este número fixo por espécie. Como controle negativo, cinco *seedlings* de *C. roseus* (pré-teste) e cinco mudas sadias de oliveira (plantas- teste) não foram expostas aos insetos em cada repetição do experimento. Após o PAI, todas as plantas-teste e pré-teste foram mantidas em estufa com tela antiafídeos livre de cigarrinhas, onde receberam fertirrigação, conforme já mencionado.

4.2.4. Detecção de Xylella fastidiosa em plantas

Após 12 meses da inoculação pelas cigarrinhas, amostras de folhas das plantas-teste e pré-teste, com 0,1 g de pecíolo cortado, passaram por extração de DNA pelo método de CTAB (Brometo de cetiltrimetilamônio) baseado no protocolo descrito por Murray & Thompson (1980), com modificações.

Inicialmente, as amostras foram adicionadas em cadinho de porcelana e macerados com auxílio de um pistilo do mesmo material, juntamente com 1 ml do tampão (Tris-HCl 1M pH 7,5, EDTA 5M, NaCl 5M, H₂O destilada). Após maceradas as amostras foram transferidas para microtubos de 2,0 ml, na capela de exaustão, foi adicionado 600 µl do tampão (CTAB 5%, Sarkosyl 10% (Sodium N-dodecanoyl-N-methylglycinate), PVP 10% (polivinil

pirrolidona iodo), 140mM β-Mercaptoetanol, H₂O destilada) e Incubaram-se as amostras por 30 min a 65 °C. Posteriormente, Os tubos contendo as amostras foram centrifugados a 4.000 rpm por 5 min a 25°C (Centrífuga Modelo MIKro 22R, Hettich). Na capela, aproximadamente 700 µl do sobrenadante obtido na centrifugação foi transferido para tubos novos de 1,5 ml. Adicionou-se, 700 µl de CIA (clorofórmio:álcool isoamílico) (24:1) e 70 µl de CTAB 10%, e agitou-se manualmente por inversão delicadamente por 2 min. Os tubos foram centrifugados por 8 min a 12.000 rpm a 25°C. Na capela novamente, transferiu-se aproximadamente 600 µl do sobrenadante para novos tubos de 1,5 ml, adicionando-se, 600 µl do tampão de precipitação (CTAB 1%, Tris-HCl 1M pH 7,5, EDTA 5M, H₂O destilada) e agitou-se delicadamente por inversão por 2 min, ficando em repouso em temperatura ambiente por 15 min. As amostras foram centrifugadas novamente por 4 min a 10.000 rpm a 25°C. O sobrenadante foi descartado cuidadosamente, restando apenas o "pellet", e foi adicionado 400 µl de tampão TE alto sal (Tris-HCl 1M pH7,5, EDTA 5M, NaCl 5M, H₂O destilada). As amostras foram incubadas por 5 min a 65°C. Posteriormente, o DNA foi precipitado adicionando-se 800 µl de etanol etílico absoluto gelado e agitado delicadamente por inversão por 2 min. As amostras foram acondicionados em freezer (-20°C) por duas horas ou no ultrafreezer (-80°C) por 20 min. Após esse período, foram centrifugadas a 12.000 rpm por 10 min a 4°C, sendo o sobrenadante descartado cuidadosamente, ficando apenas o "pellet". Adicionou-se 700 µl de álcool etílico 70% gelado e centrifugou-se a 12.000 por 5 min a 4°C. Novamente o sobrenadante foi descartado e o "pellet" foi seco em estufa por 20 min a 40°C, ou até os tubos estarem completamente secos. Em seguida as amostras foram ressuspendidas em 200 µl de solução contendo tampão TE 1/10 (Tris-HCl 1M pH 7,5; EDTA 0,5 M; H₂O destilada) e RNAse (Promega A7973) e incubados por 30 min a 37°C. Posteriormente foram estocados em freezer (-20°C) até a realização da PCR em tempo real (qPCR).

O DNA extraído foi quantificado em um Epoch Espectrofotômetro (BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT). A concentração de DNA nas amostras foi padronizada em 20 a 100 ng/µl. O qPCR foi realizado utilizando os pares de primers CVC-1/CCSM-1 com sonda CVC (Oliveira et al. 2002) e 5x Hot FIREPol® Blend Master Mix (Solis BioDyne). Utilizou-se o equipamento ViiA7 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster, CA) ajustado para as seguintes condições de amplificação: um ciclo de pré-incubação a 50 °C por 2 min; um ciclo de desnaturação a 95 °C por 2 min e 40 ciclos de desnaturação a 95 °C por 15 s e anelamento/extensão a 60 °C por 1 min depois de cada ciclo. Em cada reação foi adicionado uma amostra de controle positivo cujo DNA foi extraído de planta de oliveira

previamente considerada positiva para *X. fastidiosa* e um controle negativo (água ultra-pura). Todas as amostras foram realizadas em duplicata. Amostras que apresentaram valores de CT \leq 33 (cycle threshold) foram consideradas positivas de acordo com Fadel et al. (2014).

As amostras de plantas-teste ou pré-teste consideradas positivas por qPCR foram analisadas por MLST conforme descrito por Safady et al. (2019), com a finalidade de verificar se a bactéria transmitida foi a estirpe em estudo (ST16). Para a metodologia MLST, sete loci (leuA, petC, malF, cysG, holC, nuoL e gltT) foram amplificados. Uma alíquota da reação foi usada para confirmar o tamanho do amplicon em géis de agarose (1%), com a utilização do Lambda DNA (Thermo Fisher Scientific, Whalthan, MA), e a amostra restante (aproximadamente 20 µL) foi usada para limpeza de PCR usando o kit ExoSAP-IT (Thermo Fisher Scientific, Whalthan, MA), e a amostra restante (aproximadamente 20 µL) foi usada para limpeza de PCR usando o kit ExoSAP-IT (Thermo Fisher Scientific, Whalthan, MA). O amplicon foi sequenciado diretamente em ambas as fitas (sequenciador ABI 3130, Life Technologies). As sequências direta e reversa de cada isolado foram montadas no software Sequencher® version 5.4.6 (DNA sequence analysis software, Gene Codes Corporation, Ann Arbor, MI USA). Os polimorfismos de nucleotídio único (SNPs) foram verificados manualmente nos eletroferogramas. Sequências de referência de cada locus MLST foram baixadas do banco de dados *X. fastidiosa* MLST (<http://pubmlst.org/xfastidiosa/>) e alinhadas com as sequências obtidas usando o software Mega v.6.06 (Tamura et al. 2013).

4.2.5. Análise estatística

Para avaliar a eficiência da transmissão, calculou-se a probabilidade de transmissão (P) de *X. fastidiosa* por um único indivíduo pela fórmula: P = 1 - (1 - T) ^{1/k}, em que T se refere às taxas de transmissão para plantas-teste e k é o número de insetos usados por planta-teste durante o PAI (Swallow 1985).

As taxas de sobrevivência das 20 espécies de cigarrinhas durante o PAI em plantasteste de oliveira foram analisadas pelo modelo linear generalizado (GLM), com distribuição quase-binomial e função de ligação logit. O ajuste do modelo foi avaliado por intermédio do envelope simulado meio normal com pacote "hnp" (Moral et al. 2017). A comparação de taxas médias de sobrevivência foi realizada com contrastes do modelo selecionado (P < 0,05), utilizando a função "glht" do pacote Multocomp (Hothorn et al. 2008). Toda a análise de sobrevivência foi realizada no software estatístico R (R Core Team 2021).

4.3. Resultados

Foram positivas por qPCR, plantas-teste de oliveira inoculadas por 14 espécies de cigarrinhas, sendo 11 da subfamília Cicadellinae, tribo Cicadellini: *E. hertha, E. phoenicea, E. sinvali, M. cavifrons, M. leucomelas, O. triplehorni, P. mollicella, S. paula, S. sagata, S. grossa* e *S. punctatissima*; e três espécies da família Cercopidae: *D. schach, N. entreriana* e *S. rubra* (Tabela 5). As médias de probabilidade de transmissão estimadas para um único indivíduo (P) (baseadas em duas a três repetições) variaram de 0,4 a 12,9% para as seguintes espécies: *N. entreriana* (9,2%), *E. hertha, E. phoenicea* (1,6%), *E. sinvali* (4,8%), *M. cavifrons* (1,8%), *M. leucomelas* (1,7%), *Oragua triplehorni* (0,4%), *S. paula* (12,9%), *S. sagata* (0,7%), *S. grossa* (0,5%) (Tabela 5, figura 42). Não foi estimada a probabilidade de transmissão para espécies de cigarrinhas avaliadas com pequenos números de plantas (<4) ou de indivíduos (<20 indivíduos), tais como *S. rubra, M. geographica, S. humeralis* e *S. punctatissima*.

Nenhuma espécie de cigarrinha coletada no campo transmitiu *X. fastidiosa* para as plantas pré-teste (*C. roseus*), e nenhuma das plantas mantidas como controle negativo foram positivas para *X. fastidiosa*. Pela análise de MLST, confirmou-se a identidade de *X. fastidiosa* detectada nas plantas-teste positivas como ST 16.

A taxa média de sobrevivência das cigarrinhas após o PAI de 24 h em plantas-teste de oliveira variou de $32,67\pm21,42\%$ a $100,00\pm0,0\%$ (Tabela 6). A partir da análise de deviance encontrou-se diferença estatística significativa (P = 0,0223) na taxa média sobrevivência das espécies testadas durante os ensaios. As espécies *E. hertha*, *E. sinvali*, *M. leucomelas*, *S. paula*, e *S. grossa*, apresentaram uma sobrevivência mais elevada (acima de 80%), e as espécies *N. entreriana*, *P. mollicella* e *S. sagata*, apresentaram uma sobrevivência

Tabela 5.	. Taxa de transmissão) de Xylella fastidiosa pa	ira plantas teste de	e oliveira (T) e	probabilidade	de transmissão	por um único	inseto (P)	inoculadas por
espécies c	le Auchenorrhyncha ((amostras com $CT \le 33$ f	oram consideradas	s positivas por	PCR em tempo	real).			

Família		I ¹		II I		II		IV		IV		Total	
Espécies	T ^a	P ^b	Т	Р	Т	Р	Т	Р	Т	Р	Т	Р	K ^c
Cercopidae													
Deois flavopicta	_2	-	0/3	0	-	-	-	-	0/2	0	0/5	0	5
Deois schach	-	-	1/4	0.056	-	-	-	-	-	-	1/4	0.056	5
Notozulia entreriana		0	4/5	0.275	-	-	-	-	0/5	0	4/11	0.092 ± 0.092	5
Sphenorhina rubra			1/1	1	-	-	-	-	-	-	1/1	^d	5
Cicadellidae, Cicadellinae, Cicadellin	i												
Bucephalogonia xanthophis	-	-	0/6	0	0/13	0	0/12	0	-		0/31	0	5
Erythrogonia hertha	-	-	1/6	0.037	-	-	-	-	-	-	1/6	0.037	5
Erythrogonia phoenicea	0/3	0	2/9	0.048	-	-	-	-	0/3	0	2/12	0.016 ± 0.016	5
Erythrogonia sinvali	1/7	0.030	6/15	0.097	-	-	-	-	1/12	0.017	8/29	0.048 ± 0.025	5
Ferrariana trivitatta	0/17	0	0/1	0	-	-	-	-	0/4	0	0/22	0	5
Hortensia similis	0/5	0	0/1	0	-	-	-	-	0/4	0	0/13	0	5
Macugonalia cavifrons	-	-	1/11	0.019	2/12	0.037	0/9	0	-	-	3/32	0.018 ± 0.011	5
Macugonalia leucomelas	0/8	0	4/25	0.034	-	-	-	-	-	-	4/33	0.017 ± 0.017	5
Macugonalia geographica	-	-	0/1	0	-	-	-	-	-	-	0/1		2
Oragua triplehorni	0/8	0	1/15	0.007	-	-	-	-	-	-	1/23	0.004 ± 0.004	10
Plesiommata mollicella	-	-	1/2	0.129	-	-	-	-	-	-	1/2		5
Scopogonalia paula	1/2	0.129	1/2	0.129	-	-	-	-	-	-	2/4	0.129 ± 0.0003	5
Selvitsa humeralis	-	-	0/2	0	-	-	-	-	-	-	0/2		4
Sibovia sagata	0/12	0	-	-	0/8	0	1/7	0.019	-	-	1/27	0.007 ± 0.006	8
Sonesimia grossa	0/9	0	1/10	0.005	-	-	-	-	-	-	1/19	0.005 ± 0.005	10
Syncharina punctatissima	-	-	1/1	1	-	-	-	-	-	-	1/1		3

¹Repetições. ²Não testado. ^aTaxa de transmissão para plantas teste indicada pela proporção de plantas teste positivas por qPCR sobre o número total de plantas teste inoculadas. ^bProbabilidade de transmissão (P) por um único inseto estimado como P=1-(1-T)^{1/k}, onde, T = taxa de transmissão por planta teste e k = número de insetos confinado em cada planta teste durante o período de acesso a inoculação. ^cNúmero de insetos por planta teste. ^dNão estimado devido ao número insuficiente de insetos e/ou plantas avaliados.



Figura 42. Probabilidade média (±EPM) de transmissão de *Xylella fastidiosa* por espécies de Auchenorrhyncha, estimada por indivíduo, para plantas teste de oliveira.

Família Espécie	No. de réplicas	Total de indivíduos	Taxa de sobrevivência (%) ¹		
Cercopidae					
Deois flavopicta	5	17	70,0±30,0 bcd		
Deois schach	4	20	60,0±20,0 bcd		
Notozulia entreriana	11	35	52,0±6,1cd		
Sphenorhina rubra ^b	1	5	40,0		
Cicadellidae, Cicadellinae, Cicadellini					
Bucephalogonia xanthophis	31	205	67,6±7,7 cd		
Erythrogonia hertha	6	29	87,0±3,0 bcd		
Erythrogonia phoenicea	12	89	68,2±12,5 acd		
Erythrogonia sinvali	29	187	87,2±2,8 ab		
Ferrariana trivitatta	22	297	68,2±3,0 cd		
Hortensia similis	13	174	54,0±14,7 acd		
Macugonalia cavifrons	32	365	66,3±14,1 ad		
Macugonalia leucomelas	33	392	80,6±3,6 bd		
Macugonalia geographica ^b	1	2	100		
Oragua triplehorni	23	228	77,2±6,2 bd		
Plesiommata mollicella	2	67	32,7±21,4 cd		
Scopogonalia paula	4	16	100±0 bcd		
Selvitsa humeralis	2	11	75,0±25,0 bcd		
Sibovia sagata	27	150	53,4±9,8 c		
Sonesimia grossa	19	204	95,0±2,7 b		
Syncharina punctatissima ^b	1	3	33,0		

Tabela 6. Taxa média (±EPM) de sobrevivência de espécies de Auchenorrhyncha após período de acesso a inoculação de 24 h de *Xylella fastidiosa* em mudas sadias (plantas-teste) de oliveira

^aMédias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente (*P*<0,05). Totais de indivíduos avaliados por espécie são mostrados entre parênteses. ^bEspécies excluídas da análise estatística por falta de réplicas.



Figura 43. Taxa média (±EPM) de sobrevivência de espécies de Auchenorrhyncha após período de acesso a inoculação de 24 h de *Xylella fastidiosa* em mudas sadias (plantas-teste) de oliveira.

4.4. Discussão

Esse é o primeiro estudo que avalia a transmissão de X. fastidiosa subsp. pauca por cigarrinhas para plantas de oliveira no Brasil, identificando 14 espécies vetoras. Entre elas estão espécies previamente identificadas como vetores de X. fastidiosa em outras culturas no Brasil, tais como B. xanthophis em citros e cafeeiro (Marucci et al. 2008); M. leucomelas e S. grossa em citros (Lopes e Krugner 2016); e M. cavifrons, M. leucomelas e S. sagata para ameixeira (Müller et al. 2021). Por outro lado, este é o primeiro relato como vetores de X. fastidiosa para os cicadelíneos E. hertha, E. phoenicea, E. sinvali, O. triplehorni, P. mollicella, S. paula, S. punctatissima, bem como para os cercopídeos D. schach, N. entreriana, S. rubra, que são as primeiras espécies de Cercopidae relatadas como vetoras de X. fastidiosa. Para oliveira na Europa, são conhecidas três espécies vetoras, todos pertencentes à família Aphrophoridae (Cercopoidea) (Elbeaino et al. 2014), sendo P. spumarius, o principal vetor (Martelli et al. 2016), espécie não relatada no Brasil de acordo com o Catálogo Taxonômico da fauna do Brasil (<http://fauna.jbrj.gov.br/>). A ocorrência de uma mesma espécie como vetora em diferentes culturas acontece devido ao hábito polífago desses grupos de cigarrinhas, que se alimentam em diversas espécies vegetais (Redak et al. 2004). A eficiência de transmissão de X. fastidiosa ST16 por cigarrinhas para oliveira (0,4-12,9%) foi baixa em relação à relatada para X. fastidiosa subsp. fastidiosa em videira no Estados Unidos (Hill e Purcell 1995; Daugherty e Almeida 2009), mas foi similar às relatadas para *X. fastidiosa* subsp. *pauca* em cafeeiro, citros, vinca (*Catharanthus roseus* (L.)) e ameixeira no Brasil (Marucci et al. 2008; Lopes e Krugner 2016; Esteves et al. 2019; Müller et al. 2021), e em oliveira na Europa (Cornara et al. 2016a; Cavalieri et al. 2019; Bodino et al. 2021), bem como para *X. fastidiosa* subsp. *fastidiosa* em videira (*Vitis vinifera* L.) em Taiwan (Tuan et al. 2016). Mesmo nos Estados Unidos, a taxa de transmissão de *X. fastidiosa* subsp. *fastidiosa* em videira é relativamente baixa para certos vetores, como *P. spumarius* (Cornara et al. 2016b) e *Draeculacephala mine*rva Ball, 1927 (Purcell 1980, Redak et al. 2004).

As diferenças em eficiência de transmissão estão relacionadas a diversos fatores, tais como a espécie do vetor (Daugherty e Almeida 2009), região onde o inseto alimenta-se na planta (Daugherty et al. 2010; Rashed et al. 2011), preferência do vetor pela planta (Redak et al. 2004), habilidade de adquirir e inocular, inerente à espécie de cigarrinha e influenciada pela planta hospedeira da bactéria (Redak et al. 2004; Lopes et al. 2009); quantidade de bactéria presente nos vasos de xilema da planta (Almeida et al. 2001); genótipo da bactéria (Lopes et al. 2009); sintomas da doença (Daugherty et al. 2011) e influência de fatores climáticos (Bodino et al. 2021), dentre outros, o que demonstra a complexidade do processo de transmissão de *X. fastidiosa* por cigarrinhas.

A maioria das espécies de cigarrinhas avaliadas neste estudo apresentou taxas de sobrevivência acima de 60% durante as 24 h de PAI em que foram mantidas sobre plantas de oliveira. Cinco delas apresentaram sobrevivência acima de 80%, indicativo de que apresentam afinidade para alimentação em oliveira, elevando a sua importância como vetores na epidemiologia da SDFO. A afinidade com a planta hospedeira é um dos aspectos que condicionam a eficiência de transmissão (Redak et al. 2004), talvez explicando pelo menos parcialmente as taxas um pouco mais elevadas de transmissão por indivíduo observadas para *E. sinvali* e *S. paula*, que apresentaram sobrevivência de 87 e 100%, respectivamente. Entretanto, outros atributos ecológicos devem ser considerados na definição de espécies vetoras mais relevantes na disseminação de *X. fastidiosa*, tais como abundância, mobilidade, frequência de visitas na planta, locais de alimentação na planta e infectividade natural (Purcell 1985; Lopes 1999; Daugherty et al. 2010). Assim, mesmo aquelas espécies com taxas mais baixas de transmissão, como é o caso de *E. phoenicea*, *M. cavifrons*, também podem ter um papel relevante na epidemiologia, por apresentarem níveis populacionais elevados e infectividade natural em olivais (Capítulo 3).

Os resultados apresentados são importantes para definir quais espécies estão envolvidas na disseminação da doença, de modo a orientar as estratégias para o manejo dos

vetores em oliveira. Deve-se salientar que há outras espécies de cigarrinhas relatadas como predominantes em oliveira por Froza (2017), não testadas neste trabalho, que ainda precisam ser avaliadas como vetores no patossistema da SDOF. Além disso, são necessários mais estudos sobre características ecológicas das espécies identificadas como vetores, tais como densidade populacional, associação com oliveira e outras plantas hospedeiras de *X. fastidiosa* (possíveis fontes alternativas de inóculo) em olivais e infectividade natural, para melhor compreender sua importância na epidemiologia dessa doença.

4.5. Conclusões

- Os cicadelíneos E. hertha, E. phoenicea, E. sinvali, M. cavifrons, M. leucomelas, O. triplehorni, P. mollicella, S. paula, S. sagata, S. grossa e S. punctatissima, bem como os cercopídeos D. schach, N. entreriana e S. rubra, transmitem a bactéria X. fastidiosa subsp. pauca para oliveira.

Referências

- Almeida RPP, Pereira EF, Purcell AH, Lopes JRS (2001) Multiplication and movement of a citrus strain of *Xylella fastidiosa* within sweet orange. Plant Dis 85(45):382–382. https://doi.org/10.1094/PDIS.2001.85.4.382
- Almeida RPP, Nunney L (2015) How do plant diseases Caused by *Xylella fastidiosa* emerge? Plant dis 99(11):1457–1467. https://doi.org/10.1094/PDIS-02-15-0159-FE
- Bodino N, Cavalieri V, Pegoraro M, Altamura G, Canuto F, Zicca S, Fumarola G, Almeida RPP, Saponari M, Dongiovanni C, Bosco D (2021) Temporal dynamics of the transmission of *Xylella fastidiosa* subsp. *pauca* by *Philaenus spumarius* to olive plants. Entomol Generalis, 41(5):463–480. https://doi.org/10.1127/entomologia/2021/1294
- Cavalieri V, Altamura, G, Fumarola G, di Carolo M, Saponari M, Cornara D, Bosco D, Dongiovanni C (2019) Transmission of *Xylella fastidiosa* subspecies *pauca* sequence type 53 by different insect species. Insects 10(10):324. https://doi.org/10.3390/insects10100324
- Carvalho AS, Souza M (1991) Escaldadura das Folhas da Ameixeira: provável responsável pelo declínio da cultura no sul do estado de Minas Gerais. Pesq Agropec Bras 26:2015–2020
- Carvalho IGB, Esteves MB, Froza JA, Kleina HT, Souza-Neto RR, Souza AA, Colleta-Filho HD (2022) Doenças associadas à *Xylella fastidiosa* no Brasil. RAPP 28:50–68. https://doi.org/10.31976/0104-038321v280003

- Chang CJ, Garnier M, Zreik L, Rossetti V, Bové JM (1993) Culture and serological detection of the xylem-limited bacterium causing variegated chlorosis and its identification as a strain of *Xylella fastidiosa*. Curr Microbiol 27(3):137–142. https://doi.org/10.1007/BF01576010
- Coletta-Filho HD, Francisco CS, Lopes JRS, De Oliveira AF, Da Silva LFO (2016) First report of olive leaf scorch in Brazil, associated with *Xylella fastidiosa* subsp. *pauca*. Phytopathol Mediterr 55(1):3–8. https://doi.org/10.14601/Phytopathol_Mediterr-17259
- Cornara D, Saponari M, Zeilinger AR, Stradis A, Boscia D, Loconsole G, Bosco D, Martelli G, Almeida RPP, Porcelli F (2016a) Spittlebugs as vectors of *Xylella fastidiosa* in olive orchards in Italy. J Pest Sci 90:521–530. https://doi.org/10.1007/s10340-016-0793-0
- Cornara D, Sicard A, Zeilinger AR, Porcelli F, Purcell AH, Almeida RPP (2016b) Transmission of *Xylella fastidiosa* to Grapevine by the Meadow Spittlebug. Phytopathol 106(11):1285–1290. https://doi.org/10.1094/PHYTO-05-16-0202-R
- Cornara D, Morente M, Markheiser A, Bodino N, Tsai CW, Fereres A, Redak RA, Perring T, Lopes JRS (2019) An overview on the worldwide vectors of *Xylella fastidiosa*. Entomol Generalis. https://doi.org/10.1127/entomologia/2019/0811
- Cornara D, Marra M, Morente M, Garzo E, Moreno, Saponari M, Fereres A (2020) Feeding behavior in relation to spittlebug transmission of *Xylella fastidiosa*. J Pest Sci. https://doi.org/10.1007/s10340-020-01236-4
- Daugherty MP, Almeida RPP (2009) Estimating *Xylella fastidiosa* transmission parameters: decoupling sharpshooter number and feeding period. Entomol Experiment applic 132:84– 92. https://doi.org/10.1111/j.1570-7458.2009.00868.x
- Daugherty MP, Lopes JRS, Almeida RPP (2010) Vector within-host feeding preference mediates transmission of a heterogeneously distributed pathogen. Ecol Entomol 35:360– 66. https://doi.org/10.1111/j.1365-2311.2010.01189.x
- Daugherty MP, Rashed A, Almeida RPP, Perring TM (2011) Vector preference for hosts differing in infection status: Sharpshooter movement and *Xylella fastidiosa* transmission. Ecol Entomol 36(5):654–662. https://doi.org/10.1111/j.1365-2311.2011.01309.x
- Elbeaino T, Yassen T, Valentini F, Ben Moussa IE, Mazzoni V, D'Onghia AM (2014) Identification of three potential insect vectors of *Xylella fastidiosa* in southern Italy. Phytopathol Mediterr 53(1):328–332. https://doi.org/ 10.14601/Phytopathol_Mediterr-14113

- Esteves MB, Kleina HT, Sales TM, Oliveira TP, Lara IAR, Almeida RPP, Coletta-Filho HD, Lopes JRS (2019) Transmission efficiency of *Xylella fastidiosa* subsp. *pauca* sequence types by sharpshooter vectors after in vitro acquisition. Phytopathol 109:286–293. https://doi.org/10.1094/PHYTO-07-18-0254-FI
- Fadel AL, Sanches ES, Carvalho SA, Federici MT, Coletta-Filho HD (2014) Navelina ISA 315: A cultivar resistant to citrus variegated chlorosis. Crop Protect 64:115–121. https://doi.org/10.1016/j.cropro.2014.06.014
- Froza JA (2017) Levantamento de espécies de cigarrinhas (Hemiptera: Auchenorrhyncha) com ênfase em possíveis espécies vetoras de *Xylella fastidiosa* em pomares de oliveira na Serra da Mantiqueira. Dissertação, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo
- Haelterman RM, Tolocka PA, Roca ME, Guzmán FA, Fernández FD, Otero ML (2015) First presumptive diagnosis of *Xylella fastidiosa* causing olive scorch in Argentina. J Plant Pathol 97(2):393. http://doi.org/10.4454/JPP.V97I2.023
- Hill BL, Purcell AH (1995) Multiplication and movement of *Xylella fastidiosa* within grapevine and four other plants. Phytopathol 85:1368–1372. https://doi.org/10.1094/Phyto-85-1368
- Hopkins DL (1989) *Xylella fastidiosa*: xylem-limited bacterial pathogen of plants. Ann Rev Phytopathol 27(2):271–290. https://doi.org/10.1146/annurev.py.27.090189.001415
- Hothorn T, Bretz F, Westfall P (2008) Simultaneous inference in general parametric models. Biometric J 50(3):346–363. https://doi.org/10.1002/bimj.200810425
- Lopes JRS (1996) Mecanismos de Transmissão de *Xylella fastidiosa* por Cigarrinha. Laranja 17:79–92
- Lopes JRS (1999) Estudo de vetores de *Xylella fastidiosa* e implicações no manejo da clorose variegada dos citros. Laranja 20:319–328
- Lopes JRS, Daugherty MP, Almeida RPP (2009) Context-dependent transmission of a generalist plant pathogen: host species and pathogen strain mediate insect vector competence. Entomol Experiment Appl 131: 216–224. https://doi.org/10.1111/j.1570-7458.2009.00847.x
- Lopes JRS, Krugner R (2016) Transmission ecology and epidemiology of the citrus variegated chlorosis strain of *Xylella fastidiosa*. In: Brown JK (ed) Vector-mediated transmission of plant pathogens. American Phytopathological Society Press, Saint Paul, pp 195–208

- Martelli GP, Boscia D, Porcelli F, Saponari M (2016) The olive quick decline syndrome in south-east Italy: a threatening phytosanitary emergency. Eur J Plant Pathol 144:235–243. https://doi.org/10.1007/s10658-015-0784-7
- Moral RA, Hinde J, Demétrio CGB (2017) Half-normal plots and overdispersed models in R: the hnp package. J Statistic Soft 81(10): 1–23. Https://doi.org/10.18637/jss.v081.i10
- Marucci RC, Lopes JRS, Cavichioli RR (2008) Transmission efficiency of *Xylella fastidiosa* by sharpshooters (Hemiptera: Cicadellidae) in coffee and citrus. J Econ Entomol 101:1114–1121. https://doi.org/ 10.1603/0022-0493(2008)101[1114:TEOXFB]2.0.CO;2
- Murray MG, Thompson WF (1980) Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. Nucleic Acids Res 8:4321–4326. https://doi.org/10.1093/nar/8.19.4321
- Müller C, Esteves MB, Kleina HT, Nondillo A, Botton M, Lopes JRS (2021) First sharpshooter species proven as vectors of *Xylella fastidiosa* subsp. *multiplex* in *Prunus saliciana* trees in Brazil. Trop Plant Pathol. https://doi.org/10.1007/s40858-021-00430-8
- Oliveira AC, Vallim MA, Semighini CP, Araújo WL, Goldman GH, Machado MA (2002)
 Quantification of *Xylella fastidiosa* from citrus trees by real-time polymerase chain reaction assay. Phytopathol 92(10):1048–1054. https://doi.org/10.1094/PHYTO.2002.92.10.1048
- Oliveira AF, Pasqual M, Chalfun NNL, Regina MR, Del Rio C (2003) Enraizamento de estacas semilenhosas de oliveira de diferentes épocas, substratos e concentrações de ácido indobutírico. Ciên Agrotecnol 27(1):117–125. https://doi.org/10.1590/S1413-70542003000100014
- Paradella Filho O, Sugimori MH, Ribeiro IJA, Machado MA, Laranjeira FF, Garcia Junior A, Beretta MJG (1995) Primeira constatação em cafeeiro no Brasil da Xylella fastidiosa causadora da clorose variegada dos citros. Laranja 1:135–136
- Purcell AH, Finlay A (1979) Evidence for noncirculative transmission of Pierce's disease bacterium by sharpshooter leafhoppers. Phytopathol 69:393–395. https://doi.org/10.1094/Phyto-69-393
- Purcell AH (1980) Almond leaf scorch: leafhopper and spittlebug vectors. J Eon Entomol 73:834–838
- Purcell AH (1985) The ecology of bacterial and mycoplasma plant diseases spread by leafhoppers and planthoppers. In: Nault LR, Rodriguez JG (eds). The leafhoppers and planthoppers. J Wiley & Sons, New York, pp. 351–380
- R Core Team (2021) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. https://www.R-project.org/

- Rashed A, Killiny N, Kwan J, Almeida RPP (2011) Background matching behavior and pathogen acquisition: plant site preference does not predict the bacterial acquisition efficiency of vectors. Arthropod-Plant Interact 5:97–106. https://doi.org/10.1007/s11829-010-9118-z
- Redak RA, Purcell AH, Lopes JRS, Blua MJ, Mizell RF, Andersen PC (2004) The biology of xylem fluid-feeding insect vectors of *Xylella fastidiosa* and their relation to disease epidemiology. Ann Rev Entomol 49:243–270. https://doi.org/10.1146/annurev.ento.49.061802.123403
- Roberto SR, Coutinho A, Lima JEO, Miranda VS, Carlos EF (1996) Transmissão de *Xylella* fastidiosa pelas cigarrinhas Dilobopterus costalimai, Acrogonia terminalis e Oncometopia facialis em citros. Fitopatol Bras 21(4):517–518
- Saponari M, Boscia D, Nigro F, Martelli GP (2013) Identification of DNA sequences related to *Xylella fastidiosa* in oleander, almond and olive trees exhibiting leaf scorch symptoms in Apulia (Southern Italy). J Plant Pathol 95(3):668. http://doi.org/10.4454/JPP.V95I3.035
- Saponari M, Giampetruzzi A, Loconsole G, Boscia D, Saldarelli P (2019) *Xylella fastidiosa* in olive in Apulia: Where we stand. Phytopathol 109:175–186. https://doi.org/10.1094/PHYTO-08-18-0319-FI
- Silva LFO, Oliveira AF, Pio R, Zambon CR, Oliveira DL (2012) Enraizamento de estacas semilenhosas de cultivares de oliveira. Bragantia 71(4):488–492. https://doi.org/10.1590/S0006-87052012000400006
- Swallow WH (1985) Group testing for estimation infection rates and probabilities of disease transmission. Phytopathol 75:882–889. https://doi.org/10.1094/Phyto-75-882
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S (2013) MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. Mol Biol Evol 30:2725–2729. https://doi.org/10.1093/molbev/mst197
- Tuan S, Hu F, Chang H, Chang P, Chen Y, Huang T (2016) Xylella fastidiosa transmission and life history of two Cicadellinae sharpshooters, Kolla paulula and Bothrogonia ferruginea (Hemiptera: Cicadellidae), in Taiwan. J Econ Entomol 1-7. https://doi.org/10.1093/jee/tow016
- Vanhove M, Retchless AC, Sicard A, Rieux A, Coletta-Filho HD, De La Fuente L, C. Stenger DC, Almeida RPP (2019). Genomic diversity and recombination among *Xylella fastidiosa* subspecies. Appl Environ Microbiol 85(13):e02972–18. https://doi.org/10.1128/AEM.02972-18