

CROP PROTECTION

Infectividade Natural por *Xylella fastidiosa* Wells *et al.* de Cicadélíneos (Hemiptera: Cicadellidae) de Lavouras Cafeeiras do Paraná

MICHELE R.L. SILVA^{1,2}, ANA M. MENEGUIM^{1,2}, FERNANDA G. PAIÃO³, LUCIANA MENEGUIM^{1,2}, MARCELO G. CANTERI² E RUI P. LEITE JR.¹

¹Área de Proteção de Plantas, Instituto Agronômico do Paraná - IAPAR, C. postal 481, 86001-970 Londrina, PR, ruileite@iapar.br

²Depto. Agronomia, Univ. Estadual de Londrina - UEL, Rod. Celso Garcia Cid, km 380, 86051-990, Londrina, PR

³Depto. Genética, Fac. Medicina de Ribeirão Preto, Univ. São Paulo - USP, Av. Bandeirantes, 3900, 14049-900 Ribeirão Preto, SP

Neotropical Entomology 36(2):274-281 (2007)

Natural Infectivity of *Xylella fastidiosa* Wells *et al.* in Sharpshooters (Hemiptera: Cicadellidae) from Coffee Plantations of Parana, Brazil

ABSTRACT - *Xylella fastidiosa* Wells *et al.*, a gram-negative and xylem limited bacterium, causes significant economic loss on several crops, such as the leaf scorch in coffee. It is transmitted by xylem feeding insects and four sharpshooters species have been reported as vectors of *X. fastidiosa* in coffee. The objective of this study was to determine the natural infectivity of *X. fastidiosa* in five species of sharpshooters from coffee trees: *Acrogonia citrina* Marucci & Cavichioli, *Bucephalagonia xanthophis* (Berg), *Dilobopterus costalimai* Young, *Oncometopia facialis* (Signoret) and *Sonesimia grossa* (Signoret). Samples were collected from coffee plantations in five counties of the North and Northwest regions of the State of Parana, Brazil, from October 1998 through November 2001. A total of 806 samples containing three to five insects were examined for the presence of *X. fastidiosa* by using PCR and nested PCR tests. *X. fastidiosa* was present in samples of all five species of sharpshooters collected in the two coffee regions. The average level of natural infectivity potential was 30.4%. However, this natural infectivity ranged from 2.2% for *O. facialis* to 68.8% for *A. citrina*. Sharpshooters collected in the spring tended to have lower natural infectivity of *X. fastidiosa* as compared to those collected in other seasons. The results obtained showed the high potential of dissemination of *X. fastidiosa* by different insect vectors in coffee trees in Parana.

KEY WORDS: *Coffea arabica*, Coffee leaf scorch, Coffee stem atrophy, vector infectivity, Cicadellinae

RESUMO - *Xylella fastidiosa* Wells *et al.* é uma bactéria gram-negativa, limitada ao xilema de plantas e responsável por doenças de importância econômica em diversas culturas, como a requeima-da-folha ou atrofia-dos-ramos em cafeeiro. É transmitida por insetos sugadores de xilema e quatro espécies de cigarrinhas já foram descritas como transmissoras do patógeno para cafeeiro. O objetivo deste trabalho foi determinar o grau de infectividade natural por *X. fastidiosa* em cinco espécies de cigarrinhas Cicadellidae potencialmente transmissoras da bactéria para cafeeiro: *Acrogonia citrina* Marucci & Cavichioli, *Bucephalagonia xanthophis* (Berg), *Dilobopterus costalimai* Young, *Oncometopia facialis* (Signoret) e *Sonesimia grossa* (Signoret). As coletas foram realizadas em lavouras cafeeiras de cinco municípios das regiões Norte e Noroeste do Paraná, de outubro de 1998 a novembro de 2001. O total de 806 amostras contendo de três a cinco insetos foi examinado para presença de *X. fastidiosa* utilizando os testes de PCR e nested PCR. Os resultados obtidos revelaram a presença de *X. fastidiosa* em amostras de todas as cinco espécies de cigarrinhas nas duas regiões cafeeiras. O potencial infectivo natural das amostras foi de 30,4% e variou de 2,2% para *O. facialis* a 68,8% para *A. citrina*. As cigarrinhas coletadas na primavera apresentaram tendência para menor infectividade natural de *X. fastidiosa* quando comparadas com as amostras coletadas nas outras três estações do ano. Os resultados obtidos revelaram o grande potencial de disseminação de *X. fastidiosa* por insetos vetores em cafeeiros no Paraná.

PALAVRAS-CHAVE: *Coffea arabica*, requeima-das-folhas, atrofia-dos-ramos, infectividade dos vetores, Cicadellinae

Linhagens da bactéria *Xylella fastidiosa* Wells *et al.* (Xanthomonadales: Xanthomonadaceae) têm sido associadas a doenças que causam importantes perdas econômicas em diversas culturas agrícolas como alfafa, ameixa, amêndoa, café, citros, pêssego e videira (Hopkins 1989). A bactéria é responsável por doenças como o mal-de-pierce em videira, *phony* em pessegueiro, escaldadura das folhas em ameixeira, clorose variegada em citros e requeima-das-folhas ou atrofiados-ramos em cafeeiro (Leite 2002).

O primeiro relato da ocorrência de *X. fastidiosa* em cafeeiro no Brasil foi feito no estado de São Paulo, em 1995 (Paradela *et al.* 1995). Após essa primeira constatação, a bactéria foi encontrada em associação ao cafeeiro nas principais regiões produtoras de café de outros estados, incluindo Bahia, Espírito Santo, Goiás, Minas Gerais, Paraná, Rio de Janeiro, e Distrito Federal (Leite & Nunes 2003). Além do Brasil, *X. fastidiosa* foi relatada em cafeeiro também na Costa Rica causando a doença denominada crespiera (Solís *et al.* não publicado). Os sintomas apresentados por cafeeiros infectados por *X. fastidiosa* incluem seca de ramos, encurtamento de internódios, folhas cloróticas pequenas e deformadas, queima de bordos, abscisão foliar e rosetas agrupadas com frutos de menor tamanho (Lima *et al.* 1996, Queiroz-Voltan *et al.* 1998).

A disseminação da bactéria *X. fastidiosa* ocorre por insetos vetores e por meio de material propagativo contaminado. Cigarrinhas pertencentes às famílias Cercopidae, Cicadellidae e Cicadidae são consideradas potenciais vetores da bactéria (Paião *et al.* 2002, Redak *et al.* 2004). Esses insetos são cosmopolitas, sendo abundantes nos trópicos, com hábito extremamente polífago (Redak *et al.* 2004). Onze espécies de cigarrinhas (Homoptera: Cicadellidae) da subfamília Cicadellinae foram confirmadas como vetores da bactéria para citros no Brasil, incluindo *Acrogonia citrina* Marucci & Cavichioli, *A. virescens* (Metcalf), *Bucephalagonia xanthophis* (Berg), *Dilobopterus costalimai* Young, *Ferrariana trivittata* (Signoret), *Homalodisca ignorata* Melichar, *Macugonalia leucomelas* (Walker), *Oncometopia facialis* (Signoret), *Parathona gratiosa* (Blanchard), *Plesiommatia corniculata* Young e *Sonesimia grossa* (Signoret) (Fundecitrus 1999, Krüger *et al.* não publicado, Yamamoto *et al.* 2000, Redak *et al.* 2004). Além disso, todas essas espécies de cigarrinhas foram encontradas em lavouras cafeeiras no Paraná (Leite & Nunes 2003). Entretanto, apenas *B. xanthophis*, *H. ignorata*, *O. facialis* e *D. costalimai* foram confirmadas experimentalmente como transmissoras de *X. fastidiosa* em cafeeiro a partir de espécimes criados em laboratório que adquiriram a bactéria sob confinamento em plantas infectadas (Marucci 2003).

O objetivo deste trabalho foi determinar o grau de infectividade natural por *X. fastidiosa* em cigarrinhas das espécies *A. citrina*, *B. xanthophis*, *D. costalimai*, *O. facialis* e *S. grossa*, potencialmente transmissoras da bactéria para cafeeiro.

Material e Métodos

Coleta de cigarrinhas. As cigarrinhas foram coletadas a cada quinze dias, de outubro 1998 a novembro 2001, utilizando armadilha adesiva amarela e rede entomológica, em

lavouras cafeeiras comerciais estabelecidas nos municípios de Londrina e Ribeirão do Pinhal, e Altônia, Mandaguari e Paranavaí localizadas nas regiões Norte e Noroeste do Paraná, respectivamente. Cada área de amostragem foi constituída por cinco blocos de três linhas, contendo 30 plantas de café do cultivar Catuaí em cada linha amostral. Em cada bloco foram amostradas três plantas ao acaso. Na amostragem com armadilha adesiva foi colocado um cartão adesivo amarelo (22 x 10 cm) por planta na parte externa da copa, a uma altura de 1,5 a 2,0 m do solo.

A cada quinze dias, as armadilhas adesivas contendo os insetos foram recolhidas e acondicionadas em caixas de isopor para transporte ao laboratório de entomologia do IAPAR, em Londrina, PR. Na amostragem com rede entomológica foram efetuadas duas redadas em cada quadrante da planta, totalizando oito redadas por cafeeiro. As amostras das coletas com rede entomológica foram acondicionadas em sacos plásticos e mantidas em caixa de isopor para transporte ao laboratório, onde os insetos coletados foram separados com auxílio de microscópio estereoscópico. Após a separação dos espécimes, estes foram acondicionados em tubos de ensaio e mantidos em freezer a -20°C até o momento do processamento de cada amostra. A identificação das espécies foi realizada no Centro de Identificação de Insetos Fitófagos da Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR. Entre as mais de 100 espécies de cigarrinhas coletadas durante os três anos de levantamento nas cinco localidades, somente as espécies *A. citrina*, *B. xanthophis*, *D. costalimai*, *O. facialis* e *S. grossa* foram selecionadas e incluídas neste estudo. Essas espécies, já descritas como transmissoras de *X. fastidiosa* em pomares cítricos (Fundecitrus 1999), são consideradas vetorais potenciais da bactéria em cafezais (Leite & Nunes 2003).

Extração de DNA. As cabeças ou cibários das cigarrinhas foram removidas e processadas para extração de DNA bacteriano total. Cada amostra foi constituída de três a cinco cabeças ou cibários. As amostras de cigarrinhas foram acondicionadas em microtubos (1,5 ml) e maceradas em nitrogênio líquido com auxílio de micropistilo. Em seguida, foram adicionados a cada tubo 300 µl de tampão succinato citrato fosfato (SCP) acrescidos de ascorbato de sódio 0,1 M e de polivinilpolipirrolidona (PVPP) 3%, previamente tratado com ácido clorídrico 3 M (Holben *et al.* 1988). A extração de DNA das amostras foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Ausubel *et al.* (1992). O isolado IAPAR 14106 de *X. fastidiosa* estabelecido de cafeeiro, cultivar IAPAR 59, coletado em Ribeirão do Pinhal, PR, teve também o seu DNA extraído conforme a metodologia descrita por Ausubel *et al.* (1992). Esse DNA bacteriano ou células da bactéria adicionada à amostra de cigarrinha foi utilizado como controle positivo nos testes de PCR e nested PCR.

Detecção de *X. fastidiosa* em cigarrinhas por PCR e nested PCR. A detecção de *X. fastidiosa* por PCR e nested PCR foi realizada em amostras compostas por três a cinco cabeças ou cibários de indivíduos adultos de cada espécie. Os primers RST31 e RST33 (Minsavage *et al.* 1994) foram utilizados na primeira amplificação do DNA bacteriano em PCR. Para nested PCR, foram desenvolvidos e utilizados os

primers RST31 interno (5'-CGA CTC CAG AGG AAT TGG C-3') e RST33 interno (5'-GGC AAT GCC GCA TCA ACA TC -3'), universais para diferentes estirpes de *X. fastidiosa*, que amplificam fragmento de 500 pb interno ao fragmento amplificado pelos primers RST31 e RST33.

A PCR foi preparada para o volume final de 25 µl, contendo 0,4 µM de cada primer, 2,5 µl de tampão da enzima 1X (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), 1,5 mM de MgCl₂, 150 µM dNTPs, 1,25 U de Taq DNA polimerase (Invitrogen) e 2 µl do extrato de DNA. Aliquota de 2 µl, sem diluir, do produto da primeira amplificação de PCR foi utilizada como DNA molde para a reação de nested PCR, a qual foi preparada nas mesmas condições da reação de PCR. A amplificação das amostras foi realizada em termociclador PTJ-100-60 (MJ Research, Inc., Watertown, MA, EUA).

Para as PCR foram utilizadas as condições descritas por Minsavage et al. (1994). Para as reações de nested PCR, as amostras foram inicialmente submetidas a denaturação inicial de 95°C por 1 min, seguidos de 35 ciclos com denaturações à mesma temperatura por 30 s, anelamento a 64°C por 30 s e extensão a 72°C por 45 s, seguido de extensão final de 5 min a 72°C. Os produtos das amplificações de PCR e nested PCR foram submetidos a eletroforese (5 V/cm) em gel de agarose (0,7%) em tampão Tris ácido acético EDTA 1X (TAE), corado com brometo de etídeo (0,5 µg/ml) e fotografado pelo sistema KODAK EDAS 120 (Eastman Kodak Company, Rochester, NY, EUA).

Análise estatística. A comparação entre as proporções do grau de infectividade natural das cigarrinhas das diferentes espécies, municípios e estações do ano foi realizada utilizando o teste de Qui-quadrado para várias proporções a 5% de significância. Para análise estatística utilizou-se o programa computacional BioEstat 3.0 (Ayres et al. 2003).

Resultados

Ocorrência de espécies de cigarrinhas. Durante os três anos de amostragens foram coletadas mais de 100 espécies diferentes de cigarrinhas de lavouras cafeeiras nos cinco municípios de regiões produtoras do Paraná, sendo que mais de 70% dos espécimes capturados pertenciam à família Cicadellidae. Entre essas espécies estão incluídas as onze espécies de cigarrinhas relatadas anteriormente como transmissoras de *X. fastidiosa* para citros no Brasil (Leite & Nunes 2003). Entretanto, apenas as espécies *A. citrina*, *B. xanthophis*, *D. costalimai*, *O. facialis* e *S. grossa* foram selecionadas para esse estudo de infectividade natural por terem sido constantes em todas as coletas, permitindo a composição de amostras representativas (Leite & Nunes 2003).

Nem todas as cinco espécies de cigarrinhas estiveram presentes em todos os municípios amostrados e nem em todas as amostragens realizadas nestes três anos. Apenas a espécie *D. costalimai* foi coletada nos cinco municípios incluídos neste estudo (Tabela 1). Em contraste, *S. grossa* e *A. citrina* foram coletadas somente em três municípios (Tabela 1). O total de 806 amostras foi coletado neste estudo, sendo que o maior número de amostras examinadas foi da espécie *D.*

costalimai, totalizando 251 amostras, e o menor número de amostras coletadas foi da espécie *A. citrina*, compreendendo somente 68 amostras (Tabela 1).

Presença das cinco espécies de cigarrinhas em municípios do Norte e Noroeste do Paraná. Nem todos os municípios amostrados apresentaram todas as espécies de cigarrinhas selecionadas para este estudo. Apenas nos municípios de Londrina e Mandaguari foram coletados espécimes das cinco espécies de cigarrinhas estudadas (Tabela 1). Por outro lado, em Altônia foram coletados espécimes de somente duas espécies de cigarrinha, *B. xanthophis* e *D. costalimai* (Tabela 1). Além disso, o número de amostras examinadas por município também variou, sendo o maior número de amostras para Mandaguari, com 246 amostras, e o menor número para Altônia, com 119 amostras (Tabela 1).

Sazonalidade das cinco espécies de cigarrinhas. Todas as cinco espécies de cigarrinhas estudadas estiveram presentes em pelo menos uma das lavouras cafeeiras em cada uma das quatro estações do ano, durante o período de outubro de 1998 a novembro de 2001 (Tabela 2). A quantidade de amostras examinadas para cada estação do ano também foi semelhante, variando de um mínimo de 187 amostras no outono para o máximo de 221 amostras no verão (Tabela 2).

Infectividade natural para *X. fastidiosa* em cinco espécies de cigarrinhas. A presença de *X. fastidiosa* foi constatada nas cinco espécies de cigarrinhas estudadas, embora tenham sido observadas variações significativas na infectividade natural para as diferentes espécies de cigarrinhas e locais de coleta das amostras (Tabela 1). A infectividade natural das amostras variou de 2,2% de amostras positivas para *X. fastidiosa* em *O. facialis* a 68,8% para *A. citrina*, ambas originárias do município de Londrina (Tabela 1). Entretanto, o valor médio de infectividade natural para *X. fastidiosa* foi de 30,4%, considerando as diferentes espécies de cigarrinhas e locais de coleta (Tabela 1). É importante salientar que em função da disponibilidade de amostras, houve variação no número de amostras examinadas para cada espécie de cigarrinha, local de coleta e estação do ano (Tabelas 1 e 2).

O maior grau de infectividade natural para *X. fastidiosa* foi observado para as amostras de *B. xanthophis*. As amostras dessa espécie de cigarrinha coletadas no município de Altônia apresentaram infectividade natural de 61,3% (Tabela 1). Enquanto que, as amostras dessa mesma espécie de cigarrinha originárias do município de Mandaguari apresentaram o grau mais baixo de infectividade para a espécie, da ordem de 22,7% (Tabela 1). De qualquer forma, a infectividade média das 204 amostras de *B. xanthophis* foi de 43,1 % (Tabela 1 e Fig. 1). *A. citrina* apresentou 41,1% de detecção de *X. fastidiosa*, destacando-se o município de Londrina com 68,8% (Tabela 1).

Em contraste, a espécie *O. facialis* apresentou os menores graus de infectividade para *X. fastidiosa*, com índice médio de 12,2% de amostras positivas para presença da bactéria (Tabela 1 e Fig. 1), sendo que para as amostras de Londrina somente 2,2% se apresentaram infectadas com *X. fastidiosa* (Tabela 1). As espécies *D. costalimai* e *S. grossa* apresentaram graus

Tabela 1. Infectividade natural por *X. fastidiosa* em cinco espécies de cigarrinhas coletadas em cafezais de diferentes municípios do Paraná.

Espécie	Município	Total de amostras	Nº amostras positivas ¹	% de amostras positivas
<i>O. facialis</i>	Paranavaí	10	3	30,0 A ²
	R. Pinhal	101	18	17,8 A
	Mandaguari	48	3	6,3 AB
	Londrina	45	1	2,2 B
		204	25	12,2
<i>D. costalimai</i>	Londrina	6	3	50,0 A
	Altônia	57	21	36,8 A
	Mandaguari	75	20	36,2 A
	R. Pinhal	69	25	26,7 A
	Paranavaí	44	9	20,5 A
	251	78	31,0	
<i>S. grossa</i>	Londrina	32	13	40,6 A
	Mandaguari	39	11	28,2 A
	R. Pinhal	8	2	25,0 A
	79	26	32,9	
<i>A. citrina</i>	Londrina	16	11	68,8 A
	Paranavaí	34	12	35,3 AB
	Mandaguari	18	5	27,8 B
	68	28	41,1	
<i>B. xanthophis</i>	Altônia	62	38	61,3 A
	Londrina	36	18	50,0 A
	Paranavaí	40	17	43,0 AB
	Mandaguari	66	15	22,7 B
	204	88	43,1	
Total		806	245	30,4

¹Amostras positivas determinadas por nested PCR utilizando os primers RST31 interno e RST33 interno; ²valores seguidos da mesma letra, para mesma espécie, não diferem estatisticamente no teste de Qui-quadrado para várias proporções a 5%.

intermediários de infectividade natural para *X. fastidiosa* com valores médios de 12,2% para *D. costalimai* e 32,9% para *S. grossa* (Tabela 1 e Fig. 1).

Em relação ao local de origem, a infectividade das amostras mostrou diferenças significativas. O maior grau de infectividade das amostras foi observado em Altônia, com aproximadamente 50% das amostras com resultado positivo para presença de *X. fastidiosa* (Tabela 1 e Fig. 2). Entretanto, para esse município foram examinadas somente amostras de *B. xanthophis* e *D. costalimai* (Tabela 1).

As amostras de Mandaguari foram as que apresentaram menor grau de infectividade, com valor médio próximo a 22% (Tabela 1 e Fig. 2). Em Londrina e Mandaguari foram observados os menores graus de infectividade de amostras

para *O. facialis*, com valores de 2,2% e 6,3%, respectivamente (Tabela 1). Para as demais espécies de cigarrinhas estudadas os graus de infectividade foram superiores a 17%, cabendo salientar as amostras de Londrina, que apresentaram infectividade natural superior a 40% (Tabela 1).

As amostras de cigarrinhas coletadas na primavera apresentaram tendência para o menor potencial de infectividade natural de *X. fastidiosa* quando comparadas com as amostras coletadas nas outras três estações do ano (Tabela 2).

A infectividade das amostras não diferiu entre as estações do ano quando foram consideradas todas as cinco espécies de cigarrinhas. Por outro lado, o grau de infectividade pela bactéria variou quando as espécies de cigarrinhas foram

Tabela 2. Infectividade natural por *X. fastidiosa* nas estações do ano em cinco espécies de cigarrinhas coletadas em cafezais de diferentes municípios do Paraná.

Estação	Espécie	Total de amostras	Nº amostras positivas ¹	% de amostras positivas
Primavera	<i>A.citrina</i>	13	6	46,2 A ²
	<i>B.xanthophis</i>	54	18	33,3 A
	<i>D.costalimai</i>	54	15	27,8 AB
	<i>S.grossa</i>	22	4	18,2 AB
	<i>O.facialis</i>	48	5	10,4 B
		191	48	21,5
Verão	<i>S.grossa</i>	23	12	52,2 A
	<i>B.xanthophis</i>	54	24	44,4 A
	<i>A.citrina</i>	19	7	36,8 AB
	<i>D.costalimai</i>	65	20	30,8 AB
	<i>O.facialis</i>	60	9	15,0 B
		221	72	32,8
Outono	<i>B.xanthophis</i>	39	18	46,2 A
	<i>S.grossa</i>	23	8	34,8 AB
	<i>D.costalimai</i>	64	21	32,8 AB
	<i>A.citrina</i>	19	6	31,6 AB
	<i>O.facialis</i>	42	5	12,0 B
		187	58	31,0
Inverno	<i>A.citrina</i>	17	9	52,9 A
	<i>B.xanthophis</i>	57	28	49,1 A
	<i>D.costalimai</i>	68	22	32,4 A
	<i>S.grossa</i>	11	2	18,2 AB
	<i>O.facialis</i>	54	6	11,1 B
		207	67	32,3
Total		806	245	30,4

¹Amostras positivas determinadas por nested PCR utilizando os primers RST31 interno e RST33 interno; ²valores seguidos de mesma letra, para mesma estação, não diferem estatisticamente no teste de Qui-quadrado para várias proporções a 5%.

analisadas individualmente (Tabela 2). A espécie *O. facialis* apresentou menor percentagem de infectividade em todas as estações do ano, com valores não superiores a 15% de amostras positivas (Tabela 2). Já as espécies *A. citrina* e *B. xanthophis* apresentaram níveis de infectividade superiores a 31% em todas as estações do ano (Tabela 2). Por outro lado, a espécie *S. grossa* apresentou grau de infectividade próximo de 18% no inverno e primavera, e de até 52,9% no verão (Tabela 2).

Discussão

A nested PCR tem se mostrado uma técnica sensível para detecção de microrganismos fitopatogênicos em insetos

(Pooler et al. 1997, Ciapina et al. 2004) e plantas (Bedendo et al. 1999). Entretanto, a amplificação de DNA por PCR a partir de amostras de insetos normalmente contém componentes inibidores da reação de polimerização dificultando o processo e também reduzindo sua sensibilidade. As amplificações realizadas com o par de primers RST31 e RST33 para detecção de *X. fastidiosa* descritos por Minsavage et al. (1994) detectam o número mínimo de 10³ unidades formadoras de colônia (UFC)/ml. A nested PCR utilizando os primers RST31 e RST33 internos para amplificação de fragmento de 500 pb possibilitou detecção de até 10 UFC/ml. A segunda PCR além de diluir potenciais inibidores, amplifica o DNA de interesse em quantidade suficiente para ser visualizado em gel de agarose. Além disso, é realizada

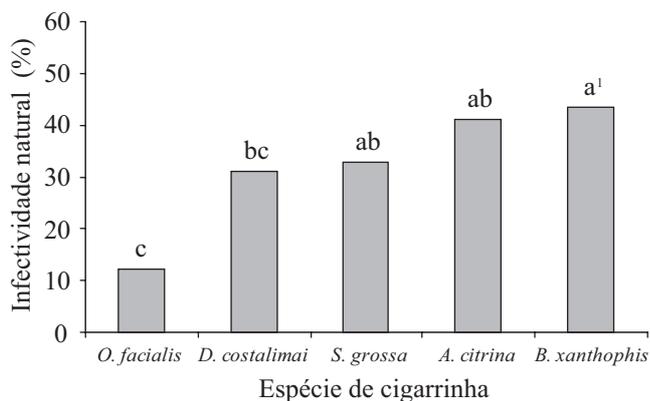


Fig. 1. Infectividade natural por *X. fastidiosa* em amostras de cigarrinhas coletadas em cafezais de cinco municípios do Paraná; ¹Valores seguidos de mesma letra não diferem estatisticamente no teste de Qui-quadrado para várias proporções a 5%.

com primers que amplificam regiões internas ao produto da primeira PCR, tornando o teste ainda mais específico.

A capacidade de transmissão de *X. fastidiosa* para plantas de café pelas cigarrinhas *B. xanthophis*, *H. ignorata*, *O. facialis* e *D. costalimai* foi demonstrada por Marucci (2003), que verificou eficiência de transmissão da bactéria entre 1,2% a 7,1%. Entretanto, esse trabalho, realizado experimentalmente, foi baseado em cigarrinhas artificialmente infectadas com *X. fastidiosa* pela alimentação em plantas doentes mantidas sob condições controladas (Marucci 2003). Até o momento a única referência sobre a infectividade natural de insetos vetores de *X. fastidiosa* para café trata de cigarras (Paião *et al.* 2002). Também são relativamente restritos os estudos já realizados sobre a infectividade natural de insetos vetores de *X. fastidiosa* em relação a doenças causadas por essa bactéria em outras plantas (Redak *et al.* 2004).

No presente estudo foram investigados os níveis de infectividade natural para *X. fastidiosa* nas espécies *A. citrina*, *B. xanthophis*, *D. costalimai*, *O. facialis* e *S. grossa*. As coletas foram realizadas em lavouras cafezeiras de cinco municípios do Norte e Noroeste do Paraná, durante o período de outubro de 1998 a novembro de 2001. O total de 806 amostras de cigarrinhas foi examinado para presença de *X. fastidiosa* utilizando testes de PCR com primers específicos para detecção da bactéria. *X. fastidiosa* esteve presente em amostras de todas as cinco espécies de cigarrinhas estudadas nas principais regiões cafezeiras do Paraná. A taxa média de infectividade natural das amostras foi de 30,4% (Tabela 1). Esse potencial infectivo de cigarrinhas vetoras de *X. fastidiosa* é superior à eficiência de transmissão da bactéria determinada em estudos experimentais com cigarrinhas infectadas artificialmente, que variou de 1,2% a 7,1% (Marucci 2003, Redak *et al.* 2004).

Embora a infectividade natural tenha sido determinada em amostras de três a cinco insetos e utilizando uma técnica de detecção e não de transmissão, evidenciou-se o grande potencial de disseminação de *X. fastidiosa* por diferentes insetos vetores em cafeeiros. A bactéria detectada nas amostras de cigarrinhas pode pertencer a linhagens de *X.*

fastidiosa que não são patogênicas ao cafeeiro. As cigarrinhas são insetos polívoros (Redak *et al.* 2004) que têm a capacidade de adquirir *X. fastidiosa* de diversas plantas hospedeiras, e não apenas de cafeeiro. Além disso, os primers utilizados nas reações de PCR são universais para as diferentes linhagens de *X. fastidiosa*.

A infectividade natural das cigarrinhas coletadas de lavouras cafezeiras do Paraná variou, particularmente em relação à espécie do inseto e local de coleta da amostra. Grande parte das informações sobre a transmissão de *X. fastidiosa* pelos seus vetores é proveniente de estudos desenvolvidos com a doença mal-de-pierce em videira (Redak *et al.* 2004). A eficiência de transmissão de *X. fastidiosa* em videira é normalmente superior a 75% para *Graphocephala atropunctata* (Signoret), o mais estudado vetor da bactéria (Redak *et al.* 2004); para *Draeculacephala minerva* Ball pode exceder 90% (Redak *et al.* 2004). As demais cigarrinhas vetoras de *X. fastidiosa* têm eficiência de transmissão da bactéria entre 0 e aproximadamente 50% (Redak *et al.* 2004).

Entre as cinco espécies de cigarrinhas vetoras de *X. fastidiosa* estudadas, *O. facialis* foi a que apresentou significativamente menor potencial infectivo, com aproximadamente 12% de infectividade natural (Tabela 1). Esse resultado está coerente com as informações disponíveis sobre transmissibilidade de *X. fastidiosa* por diferentes insetos vetores. *O. facialis* tem apresentado menor eficiência de transmissão da bactéria quando comparada com outros vetores, como *A. citrina*, *B. xanthophis* e *D. costalimai* (Redak *et al.* 2004). As diferenças na eficiência de transmissão da bactéria em outras culturas provavelmente são semelhantes para o caso de café, podendo essas variações na transmissão estar relacionadas com parâmetros específicos do inseto vetor, tais como tempo de aquisição ou inoculação, período latente, persistência da bactéria no vetor e período de incubação na planta após a inoculação (Lopes 1996).

A eficiência de transmissão de *X. fastidiosa* para citros é maior para as espécies *D. costalimai* e *B. xanthophis* do que para *Acrogonia* sp. e *O. facialis* (Redak *et al.* 2004).

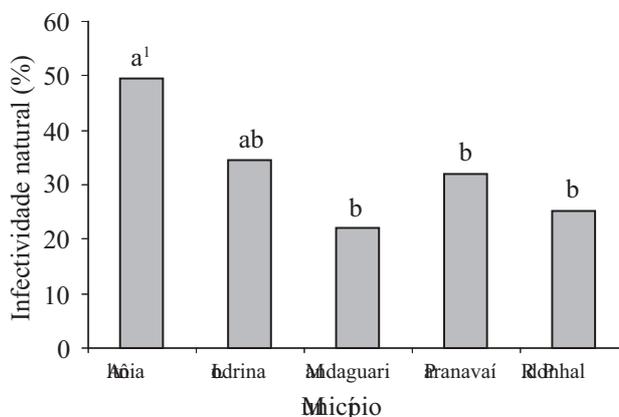


Fig. 2. Infectividade natural por *X. fastidiosa* em amostras de cigarrinhas coletadas em cafezais de cinco municípios do Paraná; ¹Valores seguidos de mesma letra não diferem estatisticamente no teste de Qui-quadrado para várias proporções a 5%.

Resultados semelhantes foram obtidos para essas mesmas espécies, exceto *Acrogonia* sp., quando testadas em relação à transmissão da bactéria para o cafeeiro (Krüger et al. 2000, Marucci 2003). No presente estudo também está evidente a menor infectividade natural de *O. facialis*, porém *B. xanthophis*, *A. citrina*, *D. costalimai* e *S. grossa* apresentaram graus similares de infectividade natural (Fig. 1).

Uma espécie vetora de *X. fastidiosa* com baixo grau de infectividade natural pode ainda ter um papel relevante na disseminação da bactéria se for abundante nas lavouras e visitar com frequência as plantas, como é o caso de *Acrogonia* sp. e *O. facialis* em pomares de citros (Lopes 1999). Todavia, vetores pouco abundantes, porém eficientes e com alta infectividade natural, também devem ser considerados relevantes (Lopes 1999).

As cigarrinhas adultas, uma vez infectadas, são capazes de transmitir a bactéria pelo resto do seu ciclo de vida, sem a necessidade de um período de latência entre a aquisição e transmissão (Purcell & Finlay 1979). Insetos imaturos mantêm a capacidade de transmissão da bactéria até a muda, na qual o forro cuticular do estomodeu é perdido (Purcell & Finlay 1979). Isso ocorre porque o inóculo da bactéria se restringe à porção anterior do aparelho digestivo e peças bucais da cigarrinha onde, aparentemente, ocorre multiplicação propagativa, mas não circulativa da bactéria (Purcell & Finlay 1979, Hopkins 1989).

É estimado que menos de cem células no inseto vetor são suficientes para transmitir a bactéria (Hill & Purcell 1995). Observações por meio de microscopia eletrônica mostraram que os sítios de retenção de *X. fastidiosa* em cigarrinhas vetoras em cafeeiro e citros são a câmara do cibário em *A. citrina*, câmara do cibário e válvula pré-cibarial em *O. facialis* e sulco apodermal em *D. costalimai*, ou seja, as mesmas regiões relatadas para cigarrinhas vetoras em videira e outras frutíferas (Alves 2003). No presente estudo, as infectividades naturais por *X. fastidiosa* das cigarrinhas *A. citrina* e *S. grossa* foram superiores às infectividades de *D. costalimai* e *O. facialis*, espécies já confirmadas como transmissoras da bactéria para cafeeiro (Marucci 2003). Embora a habilidade dessas duas espécies de cigarrinhas em transmitir a bactéria para o cafeeiro ainda não tenha sido comprovada, a presença abundante e constante em cafezais (Leite & Nunes 2003) pode ser importante para a disseminação da bactéria nessa cultura.

A infecção por *X. fastidiosa* em cafeeiros, sintomáticos e assintomáticos, de diferentes cultivares no Norte e Noroeste do Paraná foi de 50% e 59%, respectivamente (Casagrande et al. 2002). No presente estudo, maior grau de infectividade natural das cigarrinhas foi observado para o município de Altônia, localizado no Noroeste do Paraná (Fig. 1). Em contraste, o menor grau de infectividade foi encontrado para as cigarrinhas coletadas em Mandaguari (Fig. 1). O grau de infectividade natural por *X. fastidiosa* foi mais elevado em municípios cujas temperaturas médias anuais são mais altas. No município de Altônia, onde a média anual de temperatura é de 23°C, a detecção da bactéria nas amostras foi de aproximadamente 50% (Fig. 2). Por outro lado, a menor detecção da bactéria foi constatada em Mandaguari, onde a média anual de temperatura é de 20,7°C. Além do efeito que possa ter na própria bactéria *X. fastidiosa*, a temperatura é um

dos fatores ambientais de maior influência sobre os insetos, refletindo no seu metabolismo, reprodução, longevidade, comportamento alimentar, distribuição e abundância (Cividanes & Parra 1994).

A infectividade das amostras entre as estações do ano não variou quando foram consideradas conjuntamente todas as cinco espécies de cigarrinhas, porém variou quando as espécies de cigarrinhas foram analisadas individualmente. Essas diferenças no grau de infectividade natural das cinco diferentes espécies de cigarrinhas vetoras de *X. fastidiosa* de acordo com a estação do ano podem estar relacionadas a diversos fatores como principalmente hábitos de cada espécie, visto que *A. citrina*, *B. xanthophis* e *D. costalimai* são extremamente polífagas e relativamente comuns em uma grande diversidade de habitats (Redak et al. 2004).

A ocorrência de *X. fastidiosa* em cafeeiro somente foi constatada há aproximadamente 10 anos. Dessa forma, informações sobre essa associação patógeno/hospedeiro ainda são bastante escassas e muitas vezes fragmentadas. As informações sobre insetos vetoros de *X. fastidiosa* são ainda mais deficientes. Os resultados obtidos neste estudo revelaram o grande potencial de disseminação de *X. fastidiosa* por insetos vetoros em cafeeiros no Paraná e abrem novas portas de estudos sobre esse problema.

Agradecimentos

Agradecemos ao Consórcio Brasileiro de Pesquisa e Desenvolvimento do Café-CBP&D/Café pelo apoio financeiro; à Prof. Inês Cristina B. Fonseca do Departamento de Agronomia da Universidade Estadual de Londrina pelo auxílio na análise estatística e à Maria Aparecida Basseto e Adauto Pedro da Costa da Área de Proteção de Plantas do IAPAR pela assistência técnica de laboratório e campo.

Referências

- Alves, E. 2003. Adesão e colonização em vasos do xilema de laranja doce, cafeeiro, ameixeira, fumo e espécies de cigarrinhas vetoras e formação de biofilme sobre película de poliestireno. Tese de doutorado. ESALQ/USP, Piracicaba. 122 p.
- Ausubel, F.M., R. Brent, R.E. Kingston, D.D. Moore, J.A. Smith & K. Struhl. 1992 (eds). Short protocols in molecular biology. New York, John Wiley & Sons.
- Ayres, M., M. Ayres Jr., D.L. Ayres & A.A. Santos. 2003. BioEstat 3.0: Aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas. Belém: Sociedade Civil Mamirauá, Brasília, CNPq, 290p.
- Bedendo, I.P., R.E. Davis & E.L. Dally. 1999. Detecção e caracterização de fitoplasmas em plantas de vinca (*Catharanthus roseus*) e de pimenta (*Capsicum frutescens*) através das técnicas de duplo PCR e de RFLP. Summa Phytopathol. 25: 197-201.
- Casagrande, E.C., L. Meneguim, F.G. Paião & R.P. Leite. 2002.

- Levantamento de *Xylella fastidiosa* em *Coffea* spp. em regiões produtoras de café do Estado do Paraná. Fitopatol. Bras. 27: 57.
- Ciapina, L.P., L.M.C. Alves & E.G.M. Lemos. 2004. A nested-PCR assay for detection of *Xylella fastidiosa* in citrus plants and sharpshooter leafhoppers. J. Appl. Microbiol. 96: 546-551.
- Cividanes, J.F. & J.R.P. Parra. 1994. Zoneamento ecológico de *Nezara viridula* (L.), *Piezodorus guildini* (West.) e *Euchistus heros* (Fabr.) (Heteroptera: Pentatomidae) em quatro estados produtores de soja do Brasil. An. Soc. Entomol. Bras. 23: 219-226.
- Fundecitrus. 1999. Descobertos mais seis vetores de CVC. Rev. Fundecitrus 14: 8-9.
- Hill, B.L. & A.H. Purcell. 1995. Acquisition and retention of *X. fastidiosa* by an efficient vector. *Graphocephala atropunctata*. Phytopathology 85: 209-212.
- Holben, W.E., J.K. Jansson, B.K. Chelm & J.M. Tiedje. 1988. DNA probe method for the detection of specific microorganisms in the soil bacterial community. Appl. Environ. Microbiol. 54: 703-711.
- Hopkins, D.L. 1989. *Xylella fastidiosa*: Xylem-limited bacterial pathogen of plants. Annu. Rev. Phytopathol. 27: 271-290.
- Leite, R.P. 2002. Ocorrência de *Xylella fastidiosa* em café no Brasil. Summa Phytopathol. 28: 122-124.
- Leite, R.P. & L.M. Nunes. 2003. Avanços nas pesquisas sobre *Xylella fastidiosa* do café no Brasil, p. 87-101 In L. Zambolim (ed.), Produção integrada de café. Viçosa, DFP, 709p.
- Lima, J.E.O.V., S. Miranda, A. Coutinho, S.R. Roberto & E.F. Carlos. 1996. Distribuição de *Xylella fastidiosa* no cafeeiro nas regiões cafeeiras, e seu isolamento in vitro. Fitopatol. Bras. 21: 392-393.
- Lopes, J.L.S. 1996. Mecanismos de transmissão de *Xylella fastidiosa* por cigarrinhas. Laranja 17: 79-92.
- Lopes, J.L.S. 1999. Estudos com vetores de *Xylella fastidiosa* e implicações no manejo da clorose variegada dos citros. Laranja 20: 319-328.
- Marucci, R.C. 2003. Eficiência de transmissão de *Xylella fastidiosa* por cigarrinhas (Hemiptera, Cicadellidae) em *Citrus sinensis* (L.) Osbeck e *Coffea arabica* (L.). Tese de doutorado. ESALQ/USP, Piracicaba. 158p.
- Minsavage, G.V., C.M. Thompson, D.L. Hopkins, R.M.V.B.C. Leite & R.E. Stall. 1994. Development of a polymerase chain reaction protocol for detection of *Xylella fastidiosa* in plant tissue. Phytopathology 84: 456-461.
- Paião, F.G., A.M. Meneguim, E.C. Casagrande & R.P. Leite. 2002. Envolvimento de cigarras (Homoptera, Cicadidae) na transmissão de *Xylella fastidiosa* em cafeeiro. Fitopatol. Bras. 27: 67.
- Paradela Filho, O., M.H. Sugimori, I.J.A. Ribeiro, M.A. Machado, F.F. Laranjeira, A. Garcia Jr. & M.J.G. Bereta. 1995. Primeira constatação em cafeeiro no Brasil da *Xylella fastidiosa* causadora da clorose variegada dos citros. Laranja 16: 135-136.
- Pooler, M.R., I.S. Myung, J. Bentz, J. Sherald & J.S. Hartung. 1997. Detection of *Xylella fastidiosa* in potencial vectors by immunomagnetic separation and nested polymerase chain reaction. Lett. Appl. Microbiol. 25: 123-126.
- Purcell, A.H. & A.H. Finlay. 1979. Evidence for noncirculative transmission of Pierce's disease bacterium by sharpshooter leafhoppers. Phytopathology 69: 393-395.
- Queiroz-Voltan, R.B., O. Paradela Filho, M.L.C. Carelli & J.I. Fahl. 1998. Aspectos estruturais de cafeeiro infectado com *Xylella fastidiosa*. Bragantia 57: 23-33.
- Redak, R.A., A.H. Purcell, J.R.S. Lopes, M.J. Blua, R.F. Mizell & P.C. Andersen. 2004. The biology of xylem fluid feeding insect vectors of *Xylella fastidiosa* and their relation to disease epidemiology. Annu. Rev. Entomol. 49: 243-270.
- Wells, J.M., B.C. Raju, H.Y. Hung, W.G. Weisburg, L. Mandelco-Paul & D.J. Brenner. 1987. *Xylella fastidiosa* gen. nov., sp. nov.: Gram-negative, xylem-limited, fastidious plant bacteria related to *Xanthomonas* spp. Int. J. Syst. Bacteriol. 37: 136-143.
- Yamamoto, P.T. & S. Gravena. 2000. Espécies e abundância de cigarrinhas e psilídeos (Homoptera) em pomares cítricos. An. Soc. Entomol. Bras. 29: 169-176.

Received 03/III/06. Accepted 27/VII/06.