

**TRANSMISSÃO DE *Xylella fastidiosa* PARA CAFÉ PELA CIGARRINHA  
*Dilobopterus costalimai***

MARUCCI, R.C.<sup>1,2</sup>; GIUSTOLIN, T.A.<sup>1</sup>; MIRANDA, M.P.<sup>1,3</sup>; FERRAZ, P.C.<sup>1,4</sup> e LOPES, J.R.S.<sup>1</sup>

1 ESALQ/USP, C.P. 9, 13418-900, Piracicaba-SP; 2 Bolsista CAPES; 3 Bolsista FUNAPE; 4 Bolsista FAPESP;

<remarucc@carpa.ciagri.usp.br>

**RESUMO:** Desde que a bactéria *Xylella fastidiosa* mostrou ser o agente causal da requeima das folhas do cafeeiro no Brasil, cigarrinhas (Cicadellidae: Cicadellinae) têm sido associadas a vetores potenciais desse patógeno no café. Este estudo foi realizado para testar a transmissão de um isolado de café de *X. fastidiosa* por quatro espécies de cigarrinhas: *Bucephalagonia xanthophis*, *Dilobopterus costalimai*, *Homalodisca ignorata* e *Oncometopia facialis*. Adultos sadios, obtidos a partir de ninfas criadas em uma planta não-hospedeira (*Vernonia condensata*), foram submetidos à um período de acesso a aquisição de 48h em uma planta de café infectada com um isolado de café (isolado CCT-6756). Os insetos foram então confinados em grupos de três por mudas sadias (*Coffea arabica*, 'Catuaí vermelho', linhagem 99) para um período de acesso à inoculação de 48h. Três repetições de 10 mudas inoculadas foram estabelecidas para cada espécie. Para cada repetição, de 13 a 33 mudas não expostas aos insetos foram selecionadas como controle negativo. Como controle positivo, nove mudas por repetição foram inoculadas por agulha com uma suspensão ( $10^8$  UFC/mL) da bactéria. Após seis meses de período de incubação em viveiro, *X. fastidiosa* foi detectada por PCR e/ou cultura em cinco plantas-teste inoculadas por *D. costalimai* e em mais de 78% dos controles positivos. Nenhuma planta usada como controle negativo foi positiva para o patógeno e em nenhuma planta inoculada pelas outras espécies de cigarrinhas foi detectada a bactéria. O experimento mostrou que *D. costalimai* transmite o isolado de café de *X. fastidiosa* para plantas de café.

**Palavras-chaves:** *Coffea arabica*, *Xylella fastidiosa*, vetores, Cicadellidae, estirpe de café.

**TRANSMISSION OF *Xylella fastidiosa* TO COFFEE BY THE SHARPSHOOTER *Dilobopterus costalimai***

**ABSTRACT:** Since *Xylella fastidiosa* was shown to cause coffee leaf scorch in Brazil, sharpshooter leafhoppers (Cicadellidae: Cicadellinae) have been listed as potential vectors of the pathogen in coffee. This study was designed to test transmission of a coffee strain of *X. fastidiosa* by four sharpshooter species commonly found in coffee plantations, *Bucephalagonia xanthophis*, *Dilobopterus costalimai*,

*Homalodisca ignorata* and *Oncometopia facialis*. Healthy adults, obtained from nymphs reared on a non-host plant (*Vernonia condensata*) of the bacterium, were submitted to a 48-h acquisition access period on a coffee plant infected with a coffee strain of *X. fastidiosa* (isolate CCT-6756). The insects were then confined in groups of 3 (*B. xanthophis*, *D. costalimai* and *O. facialis*) or 1 (*H. ignorata*) per plant on healthy seedlings (*Coffea arabica*, ‘Catuaí vermelho’, line 99) for an inoculation access period of 48 h. Three repetitions of 10 inoculated seedlings were set up for each species. For each repetition, 13 or 33 seedlings not exposed to the insects were established as negative controls. As a positive control, 9 seedlings per repetition were needle inoculated with a suspension of the bacterium ( $10^8$  CFU/ml). After a 6-month incubation period in a screenhouse, *X. fastidiosa* was detected by PCR and culture in 5 test plants inoculated by *D. costalimai*. None of the negative control plants were positive for the pathogen. The experiment shows that *D. costalimai* can transmit the coffee strain of *X. fastidiosa* to coffee plants. No transmission was detected for the other sharpshooter species tested, with 10 months after inoculation.

**Key words:** *Coffea arabica*, *Xylella fastidiosa*, leafhopper vectors, transmission, coffee strain.

## INTRODUÇÃO

*Xylella fastidiosa* é uma bactéria fitopatogênica gram-negativa, limitada aos vasos do xilema e transmitida para as plantas através de cigarrinhas (Hemiptera: Cicadellidae: Cicadellinae). No Brasil, está associada à escaldadura das folhas da ameixa (French & Feliciano, 1982), clorose variegada dos citros (Rosseti et al., 1990) e requeima das folhas do cafeeiro (ou atrofia dos ramos do cafeeiro) (Paradella Filho et al., 1995), além de ter sido detectada em várias espécies de plantas daninhas (Lopes et al., 1999) e ornamentais (Ueno et al., 1998; Kitajima et al., 2000).

Desde a comprovação de que *X. fastidiosa* é o agente causal da requeima das folhas do cafeeiro (Lima et al., 1998), as cigarrinhas da subfamília Cicadellinae têm sido apontadas como vetores potenciais em cafezais, por já transmitirem esse patógeno em citros. Onze espécies de cicadelineos já foram confirmadas como vetores de *X. fastidiosa* para laranja doce (Lopes et al., 1996; Roberto et al., 1996; Krügner et al., 1998; Fundecitrus, 1999; Yamamoto et al., 2000). Para café, no entanto, a transmissão de *X. fastidiosa* por cigarrinhas ainda não foi determinada experimentalmente.

Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi o de testar a transmissão de um isolado de cafeeiro de *X. fastidiosa* por quatro espécies de Cicadellinae: *Bucephalagonia xanthophis*, *Dilobopterus costalimai*, *Homalodisca ignorata* e *Oncometopia facialis* (Figura 1).

## MATERIAL E METÓDOS

Para os testes de transmissão, desenvolveu-se um sistema de criação de cigarrinhas livres de *X. fastidiosa*, em que ninfas recém-eclodidas, obtidas em laboratório, são transferidas para desenvolvimento em plantas sadias ou não-hospedeiras de *X. fastidiosa*. Como não é conhecida a ocorrência da transmissão transovariana de *X. fastidiosa* (Feytag, 1951), ninfas recém-eclodidas são livres da bactéria, desde que não se alimentem em uma planta infectada. Caso contrário, a ninfa infectiva perde o inóculo ao se desenvolver em uma planta livre de *X. fastidiosa*, já que a bactéria é perdida a cada ecdise (Purcell & Finlay, 1979).

Para obtenção de ovos das cigarrinhas *D. costalimai*, *H. ignorata* e *O. facialis*, adultos coletados no campo foram confinados sobre plantas cítricas por cerca de sete dias. As folhas com posturas foram retiradas das plantas, mantidas em placas de Petri em uma incubadora a 25 °C e avaliadas diariamente quanto à eclosão de ninfas das cigarrinhas. Os pecíolos foram envolvidos com algodão umedecido, para manutenção da turgescência das folhas. Após a eclosão, as ninfas de 1<sup>o</sup> instar foram transferidas para uma gaiola de criação (50x60x70 cm) com plantas sadias de *Vernonia condensata* e citros, onde permaneceram até a emergência dos adultos. *V. condensata*, conhecida vulgarmente por falso-boldo ou alumã, é uma planta adequada para o desenvolvimento de ninfas de cigarrinhas (Almeida, 1999; Fundecitrus, 2000) e não é hospedeira de *X. fastidiosa* (R.C. Marucci, comunicação pessoal). No caso da espécie *B. xanthophis*, adultos coletados em jardins foram confinados sobre plantas de *V. condensata* para um período de oviposição de 15 a 20 dias, no interior de gaiolas teladas de 32x32x50 cm. Após esse período, as plantas contendo posturas e ninfas eclodidas foram transferidas para caixas de criação maiores (50x60x70 cm), para o desenvolvimento dos insetos até o estágio adulto.

Adultos sadios obtidos nesse sistema de criação foram confinados sobre plantas de café infectadas com um isolado de cafeeiro de *X. fastidiosa* (CCT6756, Fundação André Tosello, Campinas, SP), envoltas por um tecido do tipo “voil”, para um período de acesso à aquisição de 48h em casa de vegetação. A seguir, os insetos foram confinados sobre mudas sadias de café (*Coffea arabica*, ‘Catuaí vermelho’, clone 99), através de gaiolas de isopor com duas faces revestidas por voil e presas por elástico, para um período de acesso à inoculação (PAI) de 48h. Cada planta-teste foi inoculada por um grupo de três insetos, exceto no caso de *H. ignorata*, em que foi utilizado apenas um indivíduo por planta, devido à dificuldade de coleta de insetos desta espécie. Após o PAI, as cigarrinhas foram retiradas das gaiolas e as plantas foram transplantadas para vasos maiores e mantidas sob condições protegidas de viveiro telado. Entre 6 e 10 meses após a data de inoculação, as plantas-teste foram avaliadas quanto à infecção por *X. fastidiosa* através de isolamento em meio de cultura (Almeida et al., 2001) e PCR. Para o PCR, realizou-se extração

de DNA das plantas conforme o protocolo de Minsavage et al. (1994), modificado por Pinto & Leite (1999), seguida de amplificação com oligonucleotídeos (CVC1/272-2 int) específicos para a *X. fastidiosa* de citros (Pooler & Hartung, 1995) e de cafeeiro (H.D. Colleta Filho, comunicação pessoal).

O experimento constou de três repetições, com 10 mudas inoculadas por repetição, para cada espécie de cigarrinha. Em cada repetição, 13 (repetições I e II) ou 33 (repetição III) mudas de café não expostas aos insetos foram mantidas como controle negativo; como controle positivo, nove mudas de café foram inoculadas mecanicamente (agulha) com uma suspensão de  $\approx 10^8$  unidades formadoras de colônia (UFC)/mL do isolado CCT6756 de *X. fastidiosa*. Pelo fato de terem sido usados grupos de cigarrinhas na inoculação das plantas-teste, a taxa de transmissão por um único indivíduo foi estimada conforme Swallow (1985).

Para uma avaliação comparativa da eficiência de transmissão das estirpes de cafeeiro e de citros de *X. fastidiosa*, foram conduzidos, simultaneamente, testes de transmissão de um isolado de citros da bactéria (CCT6570, Fundação André Tosello, Campinas, SP) pela cigarrinha *D. costalimai*. Utilizaram-se, em citros, os mesmos procedimentos descritos para a aquisição e inoculação do isolado de cafeeiro, exceto a bactéria, que foi adquirida pelas cigarrinhas de uma planta cítrica infectada e transmitida para “seedlings” sadios de laranja doce (*Citrus sinensis*), variedade Westin. Foram inoculadas três repetições de 10 plantas-teste, mantendo-se, para cada repetição, 15 plantas não expostas a insetos, como controle negativo, e 8 plantas inoculadas mecanicamente, como controle positivo.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

*X. fastidiosa* foi detectada por PCR e cultura em cinco mudas de café inoculadas por *D. costalimai* e na maioria (>78%) das plantas inoculadas mecanicamente (controles positivos), nas avaliações realizadas entre 6 e 10 meses após o PAI (Tabela 1). O patógeno não foi detectado por PCR ou cultura nas plantas de café inoculadas pelas demais espécies de cigarrinhas e em nenhuma das plantas mantidas como controle negativo. Baseando-se nas estimativas da taxa de transmissão por um único indivíduo, a cigarrinha *D. costalimai* transmitiu *X. fastidiosa* (isolado CCT6756) para café com uma eficiência média de 6,2% (Tabela 1). Para as plantas de citros inoculadas nas mesmas condições, *D. costalimai* transmitiu o isolado de citros (CCT6570) com eficiência média de 6,4% (Tabela 2).

Das quatro espécies de cigarrinhas testadas, somente *D. costalimai* transmitiu o isolado de cafeeiro de *X. fastidiosa* entre plantas de café, até o momento. Embora os dados sejam ainda preliminares, coletados com apenas 6 a 10 meses da inoculação, o pequeno número de plantas positivas para a bactéria

nos testes com cigarrinhas sugere que a eficiência de transmissão da estirpe de café é baixa (<10%), o que também foi verificado para a estirpe de citros em estudos anteriores. Krügner et al. (1998) e Yamamoto et al. (2000) constataram uma eficiência de transmissão em citros variável de 1 a 12%, para várias espécies de cigarrinhas. Em contraste, a estirpe de *X. fastidiosa* que causa a doença de Pierce em videira é transmitida pela cigarrinha *Graphocephala atropunctata* com eficiência superior a 90%, durante um PAI de apenas 3h (Purcell & Finlay, 1979).

Acredita-se que o mecanismo de transmissão por vetores seja muito semelhante para as várias estirpes de *X. fastidiosa*, podendo, no entanto, haver variações em algumas características, como: tempo necessário para a aquisição ou inoculação pelo vetor, período latente, eficiência de transmissão, persistência da bactéria no vetor e período de incubação na planta após inoculação pelo vetor (Lopes, 1996). Os dados da presente pesquisa mostram que o vetor *D. costalimai* transmite a bactéria para citros e café com eficiência semelhante ( $\approx 6\%$ ). Em citros, entretanto, parece haver variação na eficiência de transmissão entre as espécies vetoras, sendo que as espécies da tribo Cicadellini (*B. xanthophis* e *D. costalimai*) transmitem *X. fastidiosa* com maior eficiência que as da tribo Proconiini (*O. facialis* e *H. ignorata*) (Krügner et al., 1998; Yamamoto et al., 2000). Uma análise comparativa da eficiência das várias espécies de cigarrinhas na transmissão de *X. fastidiosa* em café somente será possível após o término da avaliação do experimento, com 18-24 meses após as inoculações.

**Tabela 1** - Detecção de *Xylella fastidiosa* em plantas de café inoculadas por quatro espécies de cigarrinhas

Espécie (tratamento)	Repet.	No. de plantas inoculadas <sup>a</sup>	Proporção de plantas positivas <sup>b</sup>			Taxa de transmissão (P) <sup>c</sup>
			Cultura	PCR	Total	
<i>B. xanthophis</i>	I	10	0/10	0/10	0/10	0
	II	10	0/10	0/10	0/10	0
	III	3	0/3	0/3	0/3	0
<i>D. costalimai</i>	I	10	1/10	1/10	1/10	0,035
	II	10	1/10	2/10	2/10	0,072
	III	9	2/9	2/9	2/9	0,080
<i>H. ignorata</i>	I	10	0/10	0/10	0/10	0
	II	10	0/10	0/10	0/10	0
	III	10	0/10	0/10	0/10	0
<i>O. facialis</i>	I	10	0/10	0/10	0/10	0
	II	7	0/7	0/7	0/7	0
Controle negativo <sup>d</sup>	I	13	0/13	0/13	0/13	NA <sup>f</sup>
	II	13	0/10	0/13	0/13	NA
	III	33	- <sup>g</sup>	0/33	0/33	NA
Controle positivo <sup>e</sup>	I	9	5/9	7/9	7/9	NA
	II	9	5/9	7/9	8/9	NA
	III	9	-	-	-	NA

<sup>a</sup>Cada planta-teste foi inoculada por um grupo de três indivíduos, exceto no caso de *H. ignorata*, em que foi utilizado apenas um inseto por planta.

<sup>b</sup>Os testes de detecção foram realizados entre 6 e 10 meses após a inoculação.

<sup>c</sup>Taxa de transmissão por um indivíduo, estimada pela fórmula  $P = 1 - (1 - I)^{1/K}$ , em que I corresponde à proporção de plantas positivas e K ao número de insetos por planta (Swallow, 1985).

<sup>d</sup>Plantas-teste não expostas às cigarrinhas.

<sup>e</sup>Plantas-teste inoculadas mecanicamente por agulha com suspensão de *X. fastidiosa* (isolado de cafeeiro), na concentração de  $10^8$  UFC/ml.

<sup>f</sup>NA: não aplicável.

<sup>g</sup>Não testado.

**Tabela 2 - Detecção de *Xylella fastidiosa* em plantas de citros inoculadas por *D. costalimai***

Tratamento	Repet	Nº plantas inoculadas <sup>a</sup>	Proporção de plantas positivas <sup>b</sup>			Taxa de transmissão (P) <sup>c</sup>
			Cultura	PCR	Total	
<i>D. costalimai</i>	I	10	3/10	4/10	4/10	0,157
	II	10	0/10	0/10	0/10	0
	III	10	1/10	-	1/10	0,035
Controle negativo <sup>d</sup>	I	15	0/15	0/15	0/15	NA <sup>f</sup>
	II	15	0/15	0/15	0/15	NA
	III	15	- <sup>g</sup>	-	-	NA
Controle positivo <sup>e</sup>	I	8	5/8	4/8	5/8	NA
	II	8	6/8	8/8	8/8	NA
	III	8	-	-	-	NA

<sup>a</sup>Cada planta-teste foi inoculada por um grupo de três indivíduos, exceto no caso de *H. ignorata*, em que foi utilizado apenas um inseto por planta;

<sup>b</sup>Os testes de detecção foram realizados entre 6 e 10 meses após a inoculação;

<sup>c</sup>Taxa de transmissão por um indivíduo, estimada pela fórmula  $P = 1 - (1 - I)^{1/K}$ , onde I corresponde a proporção de plantas positivas e K ao número de insetos por planta (Swallow, 1985);

<sup>d</sup>Plantas-teste não expostas às cigarrinhas;

<sup>e</sup>Plantas-teste inoculadas mecanicamente por agulha com suspensão de *X. fastidiosa* (isolado de citros), na concentração de  $10^8$  UFC/ml;

<sup>f</sup>NA: não aplicável;

<sup>g</sup>Não testado.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, R.P.P. **Multiplicação e movimentação de *Xylella fastidiosa* em mudas de *Citrus sinensis* e sua eficiência de aquisição e inoculação por vetores.** Piracicaba. Dissertação (M.S.) – Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 57p. 1999.

ALMEIDA, R.P.P.; PEREIRA, E.F.; PURCELL, A.H. *et al.* Multiplication and movement of a citrus strain of *Xylella fastidiosa* within orange. **Plant Disease**, v.85, n.4, p.382-386. 2001.

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

FRENCH, W.J. & FELICIANO, A. Distribution and severity of plum leaf scald disease in Brazil. **Plant Disease**, v.66, p.515-516. 1982.

FUNDECITRUS. Descobertos mais 6 vetores de CVC. **Revista do Fundecitrus**, v.94, p.8-9. 1999.

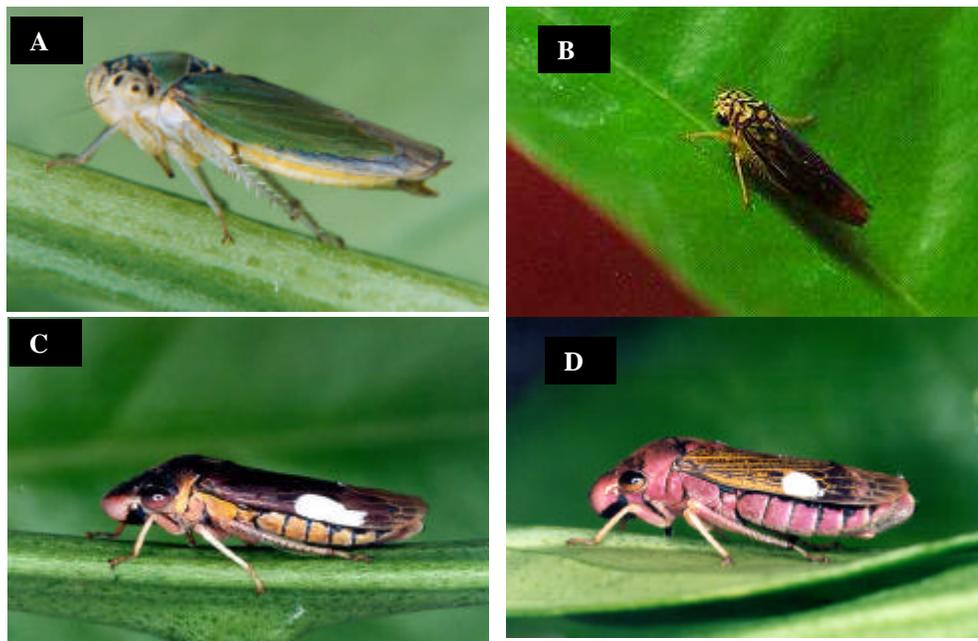
FUNDECITRUS. Descoberta abre novas frentes de combate às cigarrinhas. **Revista do Fundecitrus**, v.99, p.10-11. 2000.

- KITAJIMA, E.W.; COLETTA FILHO, H.D.; MACHADO, M.A. *et al.* Escaldura das folhas em *Hibiscus schizopetalus* associada à infecção por *Xylella fastidiosa* em Brasília-DF. **Fitopatologia Brasileira**, v.25, p.323. 2000.
- KRÜGNER, R.; LOPES, M.T.V.C.; SANTOS, J. S. *et al.* Transmission efficiency of *Xylella fastidiosa* to citrus by sharpshooters and identification of two new vector species. In: CONFERENCE OF INTERNATIONAL ORGANIZATION OF CITRUS VIROLOGISTS, Campinas. **Resumos...** Campinas, v.14, p.81. 1998.
- LIMA, J.E.O., MIRANDA, V.S., HARTUNG, J.S. *et al.* Coffee leaf scorch bacterium: axenic culture, pathogenicity, and comparison with *Xylella fastidiosa* of citrus. **Plant Disease**, v.82, n.1, p.94-97. 1998.
- LOPES, A.S.; ROBERTO, G.P. & FRANÇA, S.C. Hospedeiros alternativos de *Xylella fastidiosa* dos citros. **Fitopatologia Brasileira**, v.24: p.250 (Supl.). 1999.
- LOPES, J.R.S. Mecanismos de transmissão de *Xylella fastidiosa* por cigarrinhas. **Laranja**, v.17, p.79-92. 1996.
- LOPES, J.R.S.; BERETTA, M.J.G.; HARAKAVA, R. *et al.* A. Confirmação da transmissão por cigarrinhas do agente causal da clorose variegada dos citros, *Xylella fastidiosa*. **Fitopatologia Brasileira**, v.21, p.343. 1996. Suplemento.
- MINSAVAGE, G.V.; THOMPSON, C.M.; HOPKINS, D.L. *et al.* Development of a polymerase chain reaction protocol for detection of *Xylella fastidiosa* in plant tissue. **Phytopathology**, v.84, n.5, p.456-461. 1994.
- PARADELA FILHO, O.; SUGIMORI, M.H.; RIBEIRO, I.J.A. *et al.* Primeira constatação em cafeeiro no Brasil da *Xylella fastidiosa* causadora da clorose variegada dos citros. **Laranja**, v.16, n.2, p.135-136. 1995.
- PINTO, F.G.S. & LEITE Jr., R.P. Detecção de *Xylella fastidiosa* em *Coffea* spp através da técnica de PCR. **Fitopatologia Brasileira**, v.24, p.254 (supl.). 1999.
- POOLER, M.R. & HARTUNG, J.S. Specific PCR detection and identification of *Xylella fastidiosa* strains causing citrus variegated chlorosis. **Current Microbiology**, v.31, p.377-381. 1995.
- PURCELL, A.H. & FINLAY, A.H. Evidence for noncirculative transmission of Pierce's disease bacterium by sharpshooter leafhoppers. **Phytopathology**, v.69, p.393-395. 1979.
- ROBERTO, S.R.; COUTINHO, A.; LIMA, J.E.O; MIRANDA, V.S. *et al.* Transmissão de *Xylella fastidiosa* pelas cigarrinhas *Dilobopterus costalimai*, *Acrogonia terminalis* e *Oncometopia facialis* em citros. **Fitopatologia Brasileira**, v.21, n.4, p.517-518. 1996.
- ROSSETTI, V.; GARNIER, M.B.; BOVÉ, J.M. *et al.* Présence de bactéries dans le xylème d'orangers atteints de chlorose variégée une nouvelle maladie des agrumes au Brésil. C.R.S. **Acad. Sci. Paris**, v.310, p.345-349. 1990.

SWALLOW, W.H. Group testing for estimating infection rates and probabilities of Disease transmission. **Phytopathology**, v.75, n.8, p.882-889, 1985.

UENO, B.; FUNADA, C.K.; YORINORI, M.A. & LEITE JUNIOR, R.P. Primeiro relato da ocorrência da *Xylella fastidiosa* em *Catharanthus roseus* no Brasil. **Fitopatologia brasileira**, v.23, p.217, 1998. Suplemento.

YAMAMOTO, P.T.; ROBERTO, S.R., DALLA PRIA JR, W. *et al.* Transmissão de *Xylella fastidiosa* pelas cigarrinhas *Homalodisca ignorata*, *Acrogonia virescens* e *Molomea cincta* (Hemiptera: Cicadellidae) em plantas cítricas. **Summa Phytopathologica**, v.26, n.1, p.284, 2000.



**Figura 1** - Espécies de cigarrinhas testadas: (A) *Bucephalagonia xanthophis*, (B) *Dilobopterus costalimai*, (C) *Homalodisca ignorata* e (D) *Oncometopia facialis*.