



## MICROORGANISMOS ASSOCIADOS ÀS CIGARRINHAS VETORAS DE *Xylella fastidiosa*

Adrielle Cristine de **Souza**<sup>1</sup>; Patrícia da **Fonseca**<sup>2</sup>; Joáz Dorneles **Júnior**<sup>3</sup>; Elen Ribeiro dos Santos **Agostini**<sup>4</sup>; Simone de Souza **Prado**<sup>5</sup>

Nº 17413

**RESUMO** – As cigarrinhas são insetos sugadores da família Cicadellidae que se alimentam principalmente nos vasos do xilema de plantas de citros, café e ameixa e transmitem a bactéria *Xylella fastidiosa* para estas plantas. Os principais sintomas na planta incluem amarelecimento e redução do tamanho de folhas, encurtamento de internódios, abscisão foliar e seca de ramos. Além de patógenos de plantas, os insetos se encontram associados a simbiotes, os quais podem ou não ser encontrados em específicas células nos insetos, proporcionando um benefício mútuo na maioria dos casos. O presente estudo teve como objetivo detectar a presença do fitopatógeno *X. fastidiosa* e dos simbiotes *Candidatus Sulcia muelleri* e *Betaproteobacteria* em três espécies de cigarrinhas, coletadas em plantas de café. Inicialmente foi feita a extração do DNA das amostras, depois PCR e por último a eletroforese para visualização dos resultados em gel de agarose. Para o simbiote *S. muelleri* obtivemos 45% de todas as cigarrinhas positivas, sendo que detectamos em 62% de *Bucephalagonia xanthophis* e em 28% da espécie *Ferrariana trivittata*. Já o simbiote *Betaproteobacteria*, foi detectado em 28% de todas as 3 espécies sendo 25% na espécie *B. xanthophis*, 21% em *Acrogonia citrina* e 53% em *F. trivittata*. A bactéria fitopatogênica *X. fastidiosa* foi detectada em um total de 17% dos indivíduos e apenas na espécie *B. xanthophis*. Este é o primeiro relato da existência de diferentes microrganismos em cigarrinhas da família Cicadellidae no Brasil, no entanto não sabemos qual é o seu papel na sobrevivência e no desenvolvimento desses insetos.

**Palavras-chaves:** Cicadellidae, simbiote, bactéria fitopatogênica, extração de DNA.

1 Bolsista Embrapa: Adrielle Cristine de Souza, Graduação em Ciências Biológicas, PUCC, Campinas-SP; adrielle.cdesouza@gmail.com

2 Bolsista Embrapa: Patrícia da Fonseca, Graduação em Ciências Biológicas, PUCC, Campinas-SP.

3 Colaborador: Joáz Dorneles Júnior, Bolsista CAPS, Doutorando em Proteção de Plantas, Unesp, Botucatu-SP.

4 Colaborador: Elen Ribeiro dos Santos Agostini Técnico da Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna-SP.

5 Orientador: Simone de Souza Prado Pesquisador da Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna-SP; simone.prado@embrapa.br.



**ABSTRACT** – Sharpshooters are plant-sucking insects of the Family Cicadellidae that feed mainly on xylem vessels of citrus, coffee and plum plants and transmit the bacterium *Xylella fastidiosa* to these plants. The main symptoms in the plant include yellowing and reduction of leaf size, shortening of internodes, foliar abscission and drying of branches. In addition to plant pathogens, insects are associated with symbionts, which may or may not be found in specific insect cells, providing a mutual benefit in most cases. The present study had as objective to detect the presence of the plant pathogen *X. fastidiosa* and the symbionts *Candidatus S. muelleri* and *Betaproteobacteria* in three species of sharpshooters collected in coffee plants. DNA was extracted from the samples, then PCR was conducted. Finally the electrophoresis was performed to visualize the results on agarose gel. For the *S. muelleri* symbiont we obtained 45% of all positive insects, and detected in 62% *B. xanthophis* and in 28% of *Ferrarian trivittata*. *Betaproteobacteria* symbiont was detected in 28% of all three insect species, where 25% of which were detected in *B. xanthophis*, 21% of them in *Acrogonia citrina* and 53% in *F. trivittata*. The pathogenic bacterium *X. fastidiosa* was detected in a total of 17% of the individuals and only in the *B. xanthophis* species. This is the first report of the existence of different microorganisms in Cicadellidae in Brazil, but we do not know what their role is in the survival and development of these insects.

**Keywords:** Cicadellidae, symbiont, plant-pathogenic bacteria, DNA extraction.

## 1 INTRODUÇÃO

As cigarrinhas são insetos sugadores que se alimentam principalmente nos vasos do xilema dos citros, cafeeiro e ameixeira no Brasil. Os insetos são pertencentes a ordem Hemiptera e se dividem em mais de 70 espécies e oito famílias distintas, sendo que a maioria delas habita a vegetação rasteira (FUNDECITRUS, 2017). A cigarrinha *Bucephalagonia xanthophis* destaca-se por ser frequentemente observada em viveiros abertos (ROBERTO et al., 2000), tem importância especial porque é muito encontrada em pomares em formação, sendo provavelmente a maior responsável pela transmissão da doença “Clorose Variegada dos Citros” (CVC), conhecida como “amarelinho do citros” e da doença “Atrofia dos Ramos do Cafeeiro” (ARC). Outra cigarrinha encontrada em pomares de citros é a espécie *Acrogonia citrina*, sendo esta predominantemente encontrada na parte superior das folhas, preferindo as mais tenras e novas. A espécie *Ferrariana*



**11º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2017**  
**02 a 04 de agosto de 2017 – Campinas, São Paulo**  
**ISBN 978-85-7029-141-7**

*trivittata* ocorre abundantemente em vegetação rasteiras, como gramíneas e suas asas apresentam faixas de coloração azul e laranja (FUNDECITRUS, 2017).

A *X. fastidiosa* é uma bactéria gram-negativa patogênica às plantas, todas as espécies de cigarrinha da família Cicadellidae são potenciais vetores de *X. fastidiosa*, pois se alimentam exclusivamente nos vasos de xilema onde se aloja essa bactéria (REDAK et al., 2004).

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), os sintomas relacionados da associação de *X. fastidiosa* com cafeeiro incluem amarelecimento e redução do tamanho de folhas, encurtamento de internódios, abscisão foliar e seca de ramos (PARADELA et al., 1995).

Sabe-se que os insetos se encontram associados a diversos microrganismos, e muitos deles possuem bactérias simbiotes dentro de suas células, algumas não são capazes de existir independentemente. Segundo Prado et al. (2009) os simbiotes têm importância na determinação do desenvolvimento, sobrevivência e longevidade e tempo de geração no caso do inseto *Nezara viridula* e *Acrosternum hilare*, também pertencente a ordem Hemiptera. Os simbiotes estão divididos em primários e secundários. Os simbiotes primários vivem normalmente associados a estruturas especiais na hemocele do hospedeiro chamado bacterócitos e são fundamentais para o crescimento e desenvolvimento do hospedeiro. Já os simbiotes secundários podem se alojar na maioria dos tecidos do hospedeiro e sua relação com o mesmo nem sempre é bem definida (BAUMANN, 2005). Segundo Szklarewicz et al. (2016) os simbiotes *Candidatus Sulcia muelleri* e o *Candidatus Betaproteobacteria* são considerados respectivamente primário e secundário da cigarrinha *Evacanthus interruptus*.

O presente estudo teve como objetivo detectar a presença do patógeno *X. fastidiosa* e dos simbiotes *S. muelleri* e *Betaproteobacteria* em três espécies de cigarrinhas coletadas em plantas de café, através de extração e amplificação de DNA.

## **2 MATERIAL E MÉTODOS**

Foram coletadas cigarrinhas na plantação de café em Jaguariúna, na Embrapa Meio Ambiente, onde estava instalado o experimento FACE (“Free Air Carbon Dioxide Enrichment”) no ano de 2015. Quinzenalmente a armadilha adesiva de coloração amarela era trocada e levada ao laboratório de Entomologia e Fitopatologia (LEF). As 3 espécies de cigarrinhas coletadas para o experimento foram: *Acrogonia citrina* (46 indivíduos), *Bucephalagonia xanthophis* (148 indivíduos) e *Ferrariana trivittata* (28 indivíduos). O total de 222 indivíduos foram retirados da armadilha e



**11º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2017**  
**02 a 04 de agosto de 2017 – Campinas, São Paulo**  
**ISBN 978-85-7029-141-7**

armazenados em eppendorfs individualmente e colocados no freezer (– 20°C), para posterior processamento das amostras.

Na parte de biologia molecular do LEF da Embrapa Meio Ambiente foi realizada a extração do DNA dos insetos seguindo o protocolo de Rogers & Bendich (1988), onde as cigarrinhas foram maceradas inteiras, utilizando-se as soluções de Tampão de extração, CTAB e proteinase K e depois levadas ao banho-maria por 1 hora. Após esse tempo, foi realizada lavagens consecutivas das amostras com clorofórmio e álcool isoamílico, Isopropanol gelado e acetato de amônio centrifugando-as entre os intervalos. As amostras foram armazenadas overnight à -20°C.

Na segunda etapa da extração o sobrenadante foi descartado, lavando o pellet com álcool 70%, após isso as amostras secaram, foi acrescentado TE+RNAse, e após 30 min à 37°C, as amostras foram armazenadas novamente no freezer à -20°C.

Após a extração de DNA, 2µl de cada amostra foram alíquotadas e adicionados o par de primers *RST31* e *RST33* para detectar *X. fastidiosa* (MINSAVAGE, 1994), o par 10CFBFF e 1515R para detectar o simbionte primário *S. muelleri* (MORAN et al., 2005) e o par 16SA1 e Bet940R para detectar o simbionte secundário *Betaproteobacteria* (KOGA et al., 2013), e adicionados também o Master Mix da Promega para a reação de Polimerase em Cadeia (PCR). Para o PCR, as amostras foram colocadas no Termociclador Veriti, conforme a configuração de cada microrganismo para a amplificação do DNA. Para *X. fastidiosa* a temperatura de desnaturação foi à 95°C, a temperatura de anelamento à 55°C e a de polimerização à 72°C, para *S. muelleri* a temperatura de desnaturação foi à 94°C, de anelamento à 55°C e de polimerização à 72°C, e para *Betaproteobacteria* a temperatura de desnaturação foi à 94°C, a temperatura de anelamento à 50°C e a de polimerização à 72°C.

Após a corrida, as amostras positivas foram visualizadas em gel de agarose 1%. Foi usado um marcador de 100 pb e o RedDye (corante) para a aplicação das amostras nos 'pocinhos'. A eletroforese se deu à 80 V, 90 MA por 45 minutos. Para visualizar os resultados utilizou-se o transluminador de luz UV PhotoDoc-It, e para o registro do resultado, utilizou-se uma câmera digital acoplada ao mesmo.

### **3 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Os resultados da detecção da bactéria fitopatogênica *X. fastidiosa*, e dos simbiontes *S. muelleri* e *Betaproteobacteria* foram testadas nas espécies de cigarrinhas *B. xanthophis*, *A. citrina* e *F. trivittata* através de amplificação do DNA pela técnica de PCR e podem ser observados na Tabela 1.

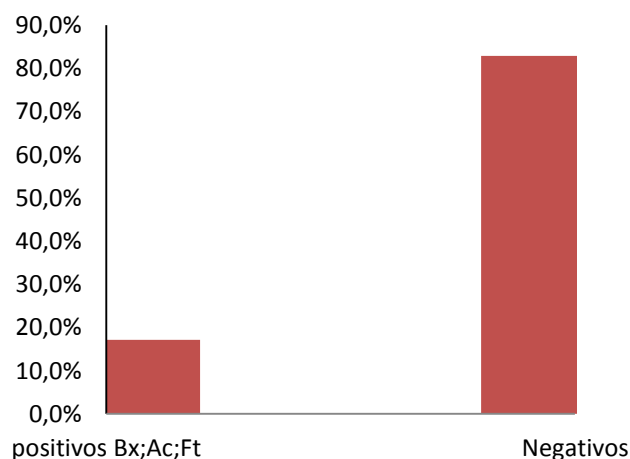


**Tabela 1.** Número total de indivíduos coletados e porcentagem de cigarrinhas das espécies, *Bucephalagonia xanthophis*, *Acrogonia citrina* e *Ferrariana trivittata* positivas para os respectivos microrganismos, *X. fastidiosa*, *Candidatus Sulcia muelleri* e *Candidatus* Betaproteobacteria testadas pela técnica PCR.

		Número de cigarrinhas positivas para o respectivo microrganismo/número total de cigarrinhas coletadas (% de cigarrinhas positivas/microrganismo)			
Cigarrinhas	Microrganismos	<i>B. xanthophis</i>	<i>A. citrina</i>	<i>F. trivittata</i>	Número total de cigarrinhas com microrganismo
		<i>X. fastidiosa</i>	37/148 (25%)	0/46	
	<i>S. muelleri</i>	92/148 (62%)	0/46	8/28 (28%)	100 (45%)
	<i>Betaproteobacteria</i>	37/148 (25%)	10/46 (21%)	15/28 (53%)	62 (28%)

A bactéria *X. fastidiosa* foi detectada somente em 37 cigarrinhas do total de 148 da espécie *B. xanthophis*. Esse resultado demonstra que *X. fastidiosa* foi detectada em apenas 17% de todas as cigarrinhas analisadas, como pode ser visualizado na Figura 1.

### Detecção de *Xylella fastidiosa*



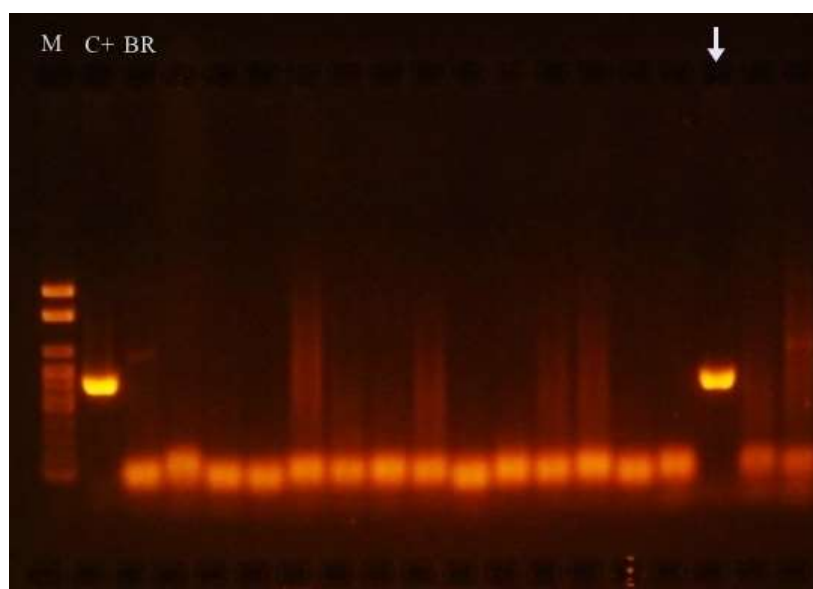
**Figura 1.** Diferença na detecção nas amostras positivas (17,12%) de cigarrinhas Bx = *B. xanthophis*, Ac = *A. citrina* e Ft = *F. trivittata* dos negativos (82,88%) na detecção da bactéria fitopatogênica *X. fastidiosa* através da técnica de PCR.



11º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2017  
02 a 04 de agosto de 2017 – Campinas, São Paulo  
ISBN 978-85-7029-141-7

Por outro lado, *X. fastidiosa* foi detectada em 37 indivíduos da cigarrinha *B. xanthophis*, ou seja, em 25% dos indivíduos coletados no cafezal. Considerando-se a baixa eficiência de transmissão da cigarrinha *B. xanthophis*, menor que 2%, mas com uma presença no campo não tão baixa de 25% de cigarrinhas infectadas, deve-se ter cuidado quando essa espécie for encontrada e coletada perto de pomares de laranja no Brasil. Considerando as espécies de cigarrinha analisadas, a cigarrinha *B. xanthophis* tem importância especial porque é muito encontrada em pomares em formação e provavelmente, é uma das maiores transmissoras da doença Clorose Variegada dos Citros para mudas de citros no Brasil (FUNDECITRUS, 2017).

De acordo com a Figura 2 é possível observar duas amostras positivas para *X. fastidiosa* sendo a primeira o controle positivo da bactéria.

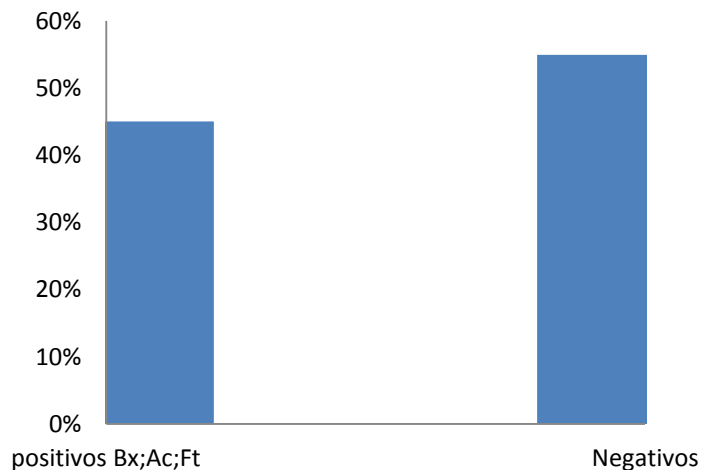


**Figura 2.** Eletroforese no gel de agarose 1% das amostras de *Bucephalagonia xanthophis* para a detecção de *Xylella fastidiosa*, indicados na figura (M) marcador, (C+) controle positivo e (BR) branco e a seta a amostra positiva. Fonte: Adrielle Cristine de Souza

O simbionte primário *Candidatus Sulcia muelleri* foi detectado em somente duas (*B. xanthophis* e *F. trivittata*) das três espécies de cigarrinhas consideradas, sendo mais frequente (62%) na espécie *B. xanthophis* (Figura 3).



### Detecção de *Sulcia muelleri*



**Figura 3.** Diferença na detecção nas amostras positivas (45%) de cigarrinhas Bx = *B. xanthophis*, Ac = *A. citrina* e Ft = *F. trivittata* dos negativos (55%) na detecção do simbiote primário *S. muelleri* através da técnica de PCR.

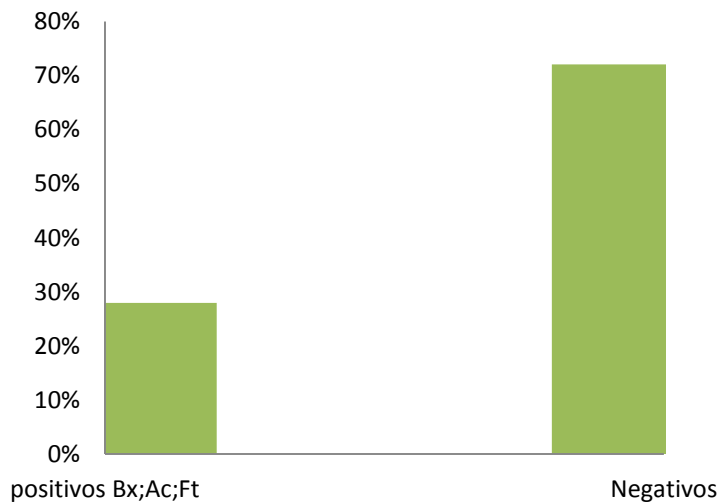
*S. muelleri* é considerada um simbiote primário, ou obrigatório, e vive obrigatoriamente associada aos bacterócitos, ou seja, a células especializadas dentro dos insetos (endossimbiontes) e são fundamentais para o crescimento e desenvolvimento do hospedeiro (BAUMANN, 2005). Segundo Szklarewicz et al. (2016) o simbiote *S. muelleri* em questão é somente um dos simbiotes primários da cigarrinha *Evacanthus interruptus*, no entanto, não o detectamos em *A. citrina*. Nesse trabalho, testamos apenas *S. muelleri* como simbiote primário, mas esta cigarrinha pode haver outro simbiote primário, ou devido ao baixo número de cigarrinhas testadas, os resultados foram mascarados.

O simbiote secundário *Betaproteobacteria* foi detectado nas três espécies de cigarrinhas conforme pode ser observado na Tabela 1 e na Figura 4. A cigarrinha *F. trivittata* obteve o maior número de indivíduos positivos (53%), seguido da espécie de cigarrinha *B. xanthophis*, a qual obteve 25% de indivíduos positivos e a espécie *A. citrina* com 21%.





## Detecção de Betaproteobactéria



**Figura 4.** Diferença na detecção nas amostras positivas (28%) de cigarrinhas Bx = *B. xanthophis*, Ac = *A. citrina* e Ft = *F. trivittata* dos negativos (72%) na detecção do simbionte secundário *Betaproteobacteria* através da técnica de PCR.

*Betaproteobacteria* foi considerada um simbionte secundário em cigarrinhas da espécie *E. interruptus*, mas pode ser detectada nas 3 espécies aqui analisadas (SZKLARZEWICZ et al., 2016), no entanto sua relação com o hospedeiro não é bem definida e neste trabalho não foi estudada (BAUMANN, 2005).

## 4 CONCLUSÃO

Através da realização deste estudo observamos a importância das bactérias simbiotes, e sua relação com as cigarrinhas, *S. muelleri* foi considerado por outros autores simbionte primário, mas não foi encontrado em todas as espécies de cigarrinhas analisadas. Já *Betaproteobacteria* que é considerado simbionte secundário, foi detectado nas 3 espécies de cigarrinhas. Este é o primeiro relato da existência de diferentes microrganismos em cigarrinhas da família Cicadellidae no Brasil, no entanto não sabemos qual é o seu papel na sobrevivência e no desenvolvimento desses insetos. Estudos posteriores sobre a relação desses microrganismos são necessários. Além





**11º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2017**  
**02 a 04 de agosto de 2017 – Campinas, São Paulo**  
**ISBN 978-85-7029-141-7**

disso foi detectado alta infectividade natural de insetos da espécie *B. xanthophis* infectadas com *X. fastidiosa*, coletadas no cafezal.

## **5 AGRADECIMENTOS**

Agradeço à Embrapa pela bolsa concedida e aos técnicos e colegas estagiários do Laboratório de Entomologia e Fitopatologia da Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna. Também agradeço ao Prof. Dr. João Lopes e a doutoranda Mariana Bossi do Laboratório de Insetos Vetores da ESALQ/USP pelos controles positivos de *X. fastidiosa*.

## **6 REFERÊNCIAS**

BAUMANN, P. Biology bacteriocyte-associated endosymbionts of plant sap-sucking insects. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v 59, p. 155-189, 2005.

FUNDECITRUS FUNDO DE DEFESA DA CITRICULTURA (Araraquara Sp). **Doenças e Pragas: Cigarrinhas**. Disponível em: <<http://www.fundecitrus.com.br/doencas/cigarrinhas/19>>. Acesso em: 23 maio 2017.

KOGA, Ryuichi et al. Evolutionary replacement of obligate symbionts in an ancient and diverse insect lineage. **Environmental Microbiology**, v. 15, n. 7, p. 2073-2081, 2013.

MINSAVAGE, G. V. 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.

MORAN, Nancy A.; TRAN, Phat; GERARDO, Nicole M. Symbiosis and insect diversification: an ancient symbiont of sap-feeding insects from the bacterial phylum Bacteroidetes. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 12, p. 8802-8810, 2005.

PARADELLA FILHO, O.; SUGIMORI, M.H.; RIBEIRO, I.J.A.; MACHADO, M.A.; LARANJEIRA, F.F.; GARCIA JR., A. & BERETTA, M.J.G. Primeira constatação em cafeeiro no Brasil, da *Xylella fastidiosa* causadora da Clorose Variegada dos Citros. **Laranja**, 16: 135-136, 1995.

PRADO, Simone S. et al. Demography of gut symbiotic and aposymbiotic *Nezara viridula* L. (Hemiptera: Pentatomidae). **Environmental entomology**, v. 38, n. 1, p. 103-109, 2009.

REDAK, R.A.; PURCELL, A.H.; LOPES, J.R.S.; BLUA, M.J.; MIZELL III, R.F. & ANDERSEN, P.C. The biology of xylem fluid-feeding insect vectors of *Xylella fastidiosa* and their relation to disease epidemiology. **Annual Review of Entomology**, 49: 243-270, 2004.



**11º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2017**  
**02 a 04 de agosto de 2017 – Campinas, São Paulo**  
**ISBN 978-85-7029-141-7**

ROBERTO, S.R.; PIRA JÚNIOR, W.D.; YAMAMOTO, P.T.; FELLIPE, M.R.; FREITAS, E.P. Espécies e flutuação populacional de cigarrinhas em viveiros de citros, em Gavião Peixoto (SP). **Laranja**, Cordeirópolis, v.21, p.65-79, 2000.

ROGERS, S. O.; BENDICH, A. J. Extraction of DNA from plant tissues, pp. A6: 1–10. **Plant Molecular Biology Manual**, edited by SB GELVIN and RA SCHILPEROORT, Kluwer Academic Publishers, Boston/MA, 1988.

SZKLARZEWICZ, Teresa et al. Bacterial symbionts of the leafhopper *Evacanthus interruptus* (Linnaeus, 1758) (Insecta, Hemiptera, Cicadellidae: Evacanthinae). **Protoplasma**, v. 253, n. 2, p. 379-391, 2016.