

**Padrões de eclosão de posturas de *Philaenus
spumarius* e *Neophilaenus campestris* (Hemiptera:
Aphrophoridae), em ambiente de semi-campo**

Larissa Kelli Kupicki

Dissertação apresentada à Escola Superior Agrária de Bragança para obtenção do Grau de Mestre em Agroecologia no âmbito da dupla diplomação com a Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Orientadores

Dra. Isabel Cristina de Sousa Rodrigues

Prof. Dr. José Alberto Cardoso Pereira

Prof. Dr. Gilberto Santos Andrade

Bragança

2024

LARISSA KELLI KUPICKI

PADRÕES DE ECLOSÃO DE POSTURAS DE *PHILAEENUS SPUMARIUS* E
NEOPHILAEENUS CAMPESTRIS (HEMIPTERA: APHROPHORIDAE), EM
AMBIENTE DE SEMI-CAMPO

Dissertação apresentada ao Instituto Politécnico de Bragança para obtenção do Grau de Mestre em Agroecologia no âmbito da dupla diplomação com a Universidade Tecnológica Federal do Paraná.

Orientadora: Dra. Isabel Cristina de Sousa Rodrigues.

Co-orientadores:

Prof. Dr. José Alberto Cardoso Pereira.

Prof. Dr. Gilberto Santos Andrade.

BRAGANÇA

2024

Este trabalho foi financiado pelo Projeto XVectors.pt: “Biology of xylem-sap feeding insect vectors and potential vectors of *Xylella fastidiosa* in Portugal” (GP/EFSA/ALPHA/2021/07) e por fundos nacionais através da FCT/MCTES (PIDDAC): CIMO, UIDB/00690/2020 (DOI: 10.54499/UIDB/00690/2020) e UIDP/00690/2020 (DOI: 10.54499/UIDP/00690/2020); e SusTEC, LA/P/0007/2020 (DOI: 10.54499/LA/P/0007/2020).



*aos meus pais, que, sob muito sol,
fizeram-me chegar até aqui,
na sombra.*

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus pelo dom da vida, por sempre iluminar meus caminhos e cuidar com tanto carinho de todos os detalhes.

O desenvolvimento deste trabalho só foi possível graças a uma parceria entre a Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR) e o Instituto Politécnico de Bragança (IPB). Agradeço pela oportunidade e por todo conhecimento adquirido durante o programa de dupla diplomação.

Agradeço ao meu co-orientador Prof. Dr. José Pereira, orientadora Dra. Isabel Rodrigues e co-orientador do Brasil Prof. Dr. Gilberto Santos Andrade pela confiança, oportunidade, orientação e conhecimentos compartilhados nesta etapa. Ao laboratório de AgroBioTecnologia/insetos da Escola Superior Agrária, e aos colegas que me auxiliaram na parte prática, agradeço o apoio, auxílio e momentos compartilhados que foram tão importantes para ajudar na concretização deste trabalho.

À minha mãe, Silvana, ao meu pai, Ivo, a minha irmã Alana e a minha cachorrinha Lola Tereza, obrigada por sempre acreditarem em mim e não medirem esforços para que eu pudesse ter as ferramentas e os meios necessários para me desenvolver pessoalmente e profissionalmente. Nada seria possível sem a base firme que vocês construíram.

Às minhas amigas do Brasil, Camila, Renata, Mariana C., Gabriela, Luana, Daniela, Mariana P., e Ana, agradeço pelo incentivo, cumplicidade, lealdade e respeito de sempre.

À minha amiga e colega de casa Mariane, obrigada pela paciência, incentivo, e principalmente por tornar minha rotina mais leve, aprendi muito com você, obrigada por ter sido meu porto seguro em Bragança.

Por fim, a todos que passaram pela minha vida, especialmente em Portugal, e contribuíram direta ou indiretamente na realização deste trabalho e formação acadêmica, o meu muito obrigada!

RESUMO

Philaenus spumarius e *Neophilaenus campestris* (Hemiptera: Aphrophoridae) são considerados vetores importantes de *Xylella fastidiosa*, uma bactéria fitopatogénica responsável por doenças severas que afetam diversas culturas agrícolas de elevado interesse económico. A compreensão da dinâmica entre as condições climáticas e a fenologia do desenvolvimento dos insetos é essencial para elucidar os ciclos de vida destes vetores e para a implementação de estratégias sustentáveis que visem mitigar a propagação desta bactéria. O presente estudo teve como objetivo investigar os padrões de eclosão dos ovos das referidas espécies de insetos vetores, bem como analisar a relação destes padrões com as variáveis ambientais de temperatura e humidade em cinco locais distintos no norte de Portugal. Indivíduos adultos foram capturados em campo, e em laboratório foram mantidos em caixas de cria com *Medicago sativa* e agulhas de pinheiro secas para promover a oviposição. No total, foram registadas três datas distintas de oviposição. As posturas de ovos foram divididas e alocadas em cinco locais experimentais, os quais apresentavam diferentes altitudes e condições de temperatura e humidade, incluindo ambientes controlados em estufas e ambientes semicampo. Os resultados demonstraram que a emergência das ninfas variou significativamente entre os diferentes locais e datas de oviposição. *Philaenus spumarius* apresentou uma emergência prolongada em condições controladas, enquanto *N. campestris* exibiu um padrão de emergência mais concentrado. Nos ambientes semicampo, a eclosão das ninfas ocorreu principalmente em fevereiro de 2024. A análise dos dados meteorológicos revelou que a temperatura e a humidade influenciaram diretamente a eclosão das ninfas, com variações marcantes observadas entre os diferentes locais.

Conclui-se que a relação entre a fenologia do desenvolvimento ninfal e as condições climáticas é complexa e variável, dependendo de múltiplos fatores ambientais. A variabilidade nas datas de emergência sublinha a necessidade urgente de desenvolver ferramentas preditivas que possam auxiliar no controlo eficaz de *P. spumarius* e *N. campestris*. Estes resultados são fundamentais para o desenvolvimento de estratégias de gestão integrada de pragas, promovendo uma abordagem mais holística e sustentável na luta contra a disseminação de *X. fastidiosa*.

Palavras-chave: Clima; controle; eclosão; ninfas; modelo preditivo; vetores; *Xylella fastidiosa*.

ABSTRACT

Philaenus spumarius and *Neophilaenus campestris* (Hemiptera: Aphrophoridae) are considered important vectors of *Xylella fastidiosa*, a phytopathogenic bacterium responsible for severe diseases affecting various agricultural crops of high economic interest. Understanding the dynamics between climatic conditions and the phenology of insect development is essential for elucidating these vectors' life cycles and implementing sustainable strategies to mitigate the spread of this bacterium. This study aimed to investigate the hatching patterns of the eggs of these insect vector species and analyze the relationship of these patterns with environmental variables of temperature and humidity at five distinct locations in northern Portugal. Adults were captured in the field and maintained in laboratory-rearing cages with *Medicago sativa* and dried pine needles to promote oviposition. A total of three distinct oviposition dates were recorded. The egg masses were divided and allocated to five experimental locations, which had different altitudes and conditions of temperature and humidity, including controlled environments in greenhouses and semi-field environments. The results demonstrated that the emergence of nymphs varied significantly among the different locations and oviposition dates. *Philaenus spumarius* exhibited prolonged emergence under controlled conditions, while *N. campestris* showed a more concentrated emergence pattern. In the semi-field environments, nymph hatching primarily occurred in February 2024. The analysis of meteorological data revealed that temperature and humidity directly influenced nymph emergence, with marked variations observed among the different locations. It is concluded that the relationship between nymphal development phenology and climatic conditions is complex and variable, depending on multiple environmental factors. The variability in emergence dates underscores the urgent need to develop predictive tools that can assist in the effective control of *P. spumarius* and *N. campestris*. These results are fundamental for developing integrated pest management strategies, promoting a more holistic and sustainable approach in the fight against the spread of *X. fastidiosa*.

Keywords: Climate; control; outbreak; nymphs; predictive model; vectors; *Xylella fastidiosa*.

Índice Geral

1. Introdução geral e objetivos	16
2. Revisão Bibliográfica	18
2.1 Descrição e biologia da <i>Xylella fastidiosa</i>	18
2.2 Plantas hospedeiras.....	18
2.3 Origem e Distribuição na Europa	19
2.4 Transmissão.....	21
2.5 Sintomatologia.....	22
2.6 Potenciais Vetores	23
2.7 Estratégias de controlo dos vetores	27
2.8 Modelo baseado em graus-dia para prever a eclosão de ovos de <i>P. spumarius</i> e <i>N. campestris</i>	29
3. Material e métodos	31
3.1 Obtenção de insetos e posturas	31
3.2 Desenho experimental.....	32
4. Resultados	36
4.1 Emergência ninfal e oviposição.....	36
4.2 Emergência ninfal e oviposição de Bragança em condições controladas de estufa	36
4.3 Emergência ninfal e oviposição de Bragança em condições de semicampo	38
4.4 Emergência ninfal e oviposição de Mirandela.....	40
4.5 Emergência ninfal e oviposição de Cova da Lua em condições de semicampo	42
4.6 Emergência ninfal e oviposição de Fragoso em condições de semicampo	44
5. Discussão	48
6. Conclusão e perspectivas futuras.....	51

Índice de Figuras

Figura 1. Distribuição mundial da <i>Xylella Fastidiosa</i> (EPPO, 2024).	20
Figura 2. Sintomas produzidos por <i>Xylella fastidiosa</i> . A. Doença de Pierce em videira. B. Branqueamento de folhas de cerejeira. C. Doença bacteriana da queimadura das folhas de carvalho. D. Folha de amêndoa descascada. E. Clorose variegada dos cítricos. F. Síndrome da deterioração rápida do azeite. Fotos A, B, DF tiradas em 17 de junho de 2020 em https://gd.eppo.int/taxon/XYLEFA/photos . Foto C tomada em 17 de junho de 2020 em https://www.vasive.org/browse/detail.cfm?imgnum=5427648	23
Figura 3. A e B <i>Philaenus Spumarius</i> adulto. Fonte: Amgueddfa Cymru - Museu Nacional do País de Gales.	24
Figura 4. Ninfas <i>Philaenus Spumarius</i> . Fonte: Inaturalist.	25
Figura 5. Coloração polimórfica de <i>Philaenus spumarius</i> . Linha superior (da esquerda para a direita): <i>populi</i> (pop), <i>typica</i> (typ), <i>praeusta</i> (pra), <i>vittata</i> (vit), <i>trilineata</i> (tri), <i>marginella</i> (mar), <i>lateralis</i> (lat). Linha inferior (da esquerda para a direita): <i>Flavicollis</i> (fla), <i>gibba</i> (gib), <i>leucocephala</i> (lce), <i>ustulata</i> (ust), <i>quadrimaculata</i> (qua), <i>albomaculata</i> (alb), <i>leucophthalma</i> (lop). Fonte: (Thompson e Halkka, 1973).	26
Figura 6. <i>Neophilaenus campestris</i> adulto. Fonte: Inaturalist.	27
Figura 7. Agulha de pinheiro com posturas de <i>P. spumarius</i>	32
Figura 8. Microcosmo em ambiente de semicampo.	33
Figura 9. Interior do microcosmo em ambiente de semicampo.	34
Figura 10. Número total de ninfas emergidas de (a) <i>Philaenus spumarius</i> e (b) <i>Neophilaenus campestris</i> por data de observação em condições controladas de estufa. 37	37
Figura 11. Dados meteorológicos de Bragança em condições controladas de estufa. ..	38
Figura 12. Número total de ninfas emergidas de (a) <i>Philaenus spumarius</i> (b) <i>Neophilaenus campestris</i> por data de observação em condições de semicampo.	39
Figura 13. Dados meteorológicos de Bragança em condições de semicampo.	40
Figura 14. Número total de ninfas emergidas de (a) <i>Philaenus spumarius</i> e (b) <i>Neophilaenus campestris</i> por data de observação em condições de semicampo.	41
Figura 15. Dados meteorológicos de Mirandela.	42
Figura 16. Número total de ninfas emergidas de (a) <i>Philaenus spumarius</i> e (b) <i>Neophilaenus campestris</i> por data de observação em condições de semicampo.	43
Figura 17. Dados meteorológicos de Cova de lua.	44
Figura 18. Número total de ninfas emergidas de (a) <i>Philaenus spumarius</i> e (b) <i>Neophilaenus campestris</i> por data de observação em condições de semicampo.	45
Figura 19. Dados meteorológicos de Fragoso.	46

Capítulo 1

Introdução geral e objetivos



1. Introdução geral e objetivos

Philaenus spumarius e *Neophilaenus campestris* (Hemiptera: Aphrophoridae) são vetores europeus confirmados de *Xylella fastidiosa*, uma bactéria fitopatogénica responsável por graves doenças em plantas de interesse económico. Estes insetos são espécies univoltinas que hibernam no estado de ovo, e as suas ninfas emergem no final do inverno ou na primavera. Prever o momento da eclosão das posturas pode ser determinante para a definição de estratégias eficazes de controlo contra estes insetos vetores e na prevenção da doença.

Assim, este estudo tem por objetivo estudar o padrão de eclosão de posturas de *P. spumarius* e *N. campestris*, em condições controladas e de semicampo, para futuramente utilizar os resultados obtidos para o desenvolvimento de um modelo de previsão que poderá ser utilizado na tomada de decisão para o controlo das populações de vetores.

O objetivo principal será alcançado através do cumprimento dos seguintes objetivos específicos;

- (i) Acompanhamento das posturas, de ambas as espécies, desde o momento que são efetuadas as posturas até à emergência das ninfas, em condições de semicampo, em cinco locais com diferentes altitudes no norte de Portugal.
- (ii) Registrar dados sobre as temperaturas diárias (média, mínima e máxima) e a humidade.

Capítulo 2

Revisão bibliográfica



2. Revisão Bibliográfica

2.1 Descrição e biologia da *Xylella fastidiosa*

Xylella fastidiosa Wells et al. (1987) é uma bactéria Gram-negativa pertencente à família das Xanthomonadaceae classificada como organismo de quarentena, estando incluída na Lista A1 da Organização Europeia e Mediterrânica para a Proteção das Plantas (EPPO) de 1981. É uma bactéria restrita ao xilema, disseminada por insetos picadores-sugadores de fluido xilémico, de crescimento muito lento, com ampla gama de plantas hospedeiras. Os números atualizados de espécies, gêneros e famílias de plantas hospedeiras é de aproximadamente 690 espécies, que afetam culturas agrícolas e florestais de grande importância econômica (EFSA 2023).

A bactéria é geneticamente diversa e possui variantes diferindo na gama de hospedeiros, patogenicidade e distribuição (Schaad et al. 2004). Atualmente está dividida em seis subespécies identificadas como: (1) *X. fastidiosa* subsp. *Fastidiosa* que infeta maioritariamente *Vitis vinifera* (videira), *Coffea* spp. (cafeeiro), *Prunus dulcis* (amendoeira) e *Citrus* spp. (cítricos), sendo esta subespécie a mais estudada (EFSA, 2013), (2) *X. fastidiosa* subsp. *pauca*, isolada do *Coffea* spp. (cafeeiro), *Citrus sinensis* (laranjeira) e *Olea europaea* (oliveira), entre outros. (Helvecio & Sousa, 2014), (3) *X. fastidiosa* subsp. *sandyi*, afeta o *Nerium oleander* (loendro) (Yuan et al., 2010), (4) *X. fastidiosa* subsp. *multiplex*, detém uma vasta gama de hospedeiros em termos de espécies de plantas expressando os sintomas da doença, como *Prunus dulcis* (amendoeira), *Prunus persica* (pessegueiro), *Prunus domestica* (ameixeira), *Quercus* spp. (carvalhos), *Rubus* spp. (frutos vermelhos), etc., (Nunney et al., 2013), (5) *Xylella fastidiosa* subsp. *morus* (Nunney et al., 2014 a,b) que infeta *Morus* spp. (amoreira) e (6) *Xylella fastidiosa* subsp. *taiwanense* (Vos et al., 2019).

2.2 Plantas hospedeiras

De acordo com os dados do relatório de 2023 da EFSA, existem atualmente 690 espécies de plantas que foram identificadas como suscetíveis à bactéria, correspondendo a 304 gêneros e 88 famílias. Em comparação com a base de dados de 2022, 15 novas espécies (e seis gêneros) foram identificados como hospedeiros de *X. fastidiosa*. As famílias mais representativas de plantas hospedeiras pertencem às Fabaceae, seguidas por

Asteraceae, Vitaceae, Poaceae e Rosaceae. Este patógeno está associado a diversas doenças em culturas de importância econômica, tais como a Doença de Pierce, Clorose Variegada dos Citrinos, Síndrome do Declínio Rápido da Oliveira, “Almond Leaf Scorch Disease”, entre outras (Hopkins & Purcell, 2002; Agrios, 2005; EPPO, 2019).

Apesar da vasta gama de hospedeiros de *X. fastidiosa*, é importante ressaltar que nem todas as espécies de plantas apresentam sintomas e são suscetíveis a doenças. Muitas espécies de plantas podem ser infectadas e permanecer assintomáticas (Jackson, 2008; EFSA, 2021).

Em Portugal, algumas espécies de plantas destacam-se pela sua suscetibilidade à *Xylella fastidiosa*. Entre elas incluem-se a videira (*Vitis vinifera*), a oliveira (*Olea europaea* L.), o loendro (*Nerium* L.), o pessegueiro (*Prunus persica*), a amendoeira (*Prunus dulcis*), a laranjeira (*Citrus sinensis*), o carvalho (*Quercus* sp.), a vinca (*Vinca* sp. L.), a malva (*Malva* sp. L.), o sorgo (*Sorgo* sp. L.), o cataranto (*Catharanthus* sp.) e a beldroega (*Portulaca* sp. L.). Outras espécies igualmente suscetíveis incluem o arbusto-borboleta (*Polygala myrtifolia*), o alecrim-costeiro (*Westringia fruticosa*), a acácia (*Acacia saligna*), a giesta (*Spartium junceum*), o alecrim (*Rosmarinus* sp.), a murta (*Myrtus communis*) e o alaterno-bastardo (*Rhamnus alaternus*) (Paula et al., 2022).

2.3 Origem e Distribuição na Europa

Estudos sobre as doenças causadas pela bactéria, incluída na Organização Europeia e Mediterrânica para a Protecção das Plantas (OEPP) Lista A1, tiveram início nos Estados Unidos, devido à presença da doença conhecida como Doença de Pierce na videira. Por muitos anos, este problema permaneceu restrito ao continente americano. Em 1994, foi observada na Ásia, especificamente em Taiwan, manifestando-se através de queimaduras foliares na pêra-asiática (Pereira 2014).

Na Europa, a presença de *X. fastidiosa* foi inicialmente reportada em 2013 na região de Apúlia, no sul da Itália (Saponari et al., 2013), onde é atualmente responsável pela morte de milhões de oliveiras (Saponari et al., 2019). Desde a sua deteção inicial, a presença da bactéria foi confirmada em outros países europeus, incluindo França, Espanha e Portugal manifestando-se em diferentes plantas hospedeiras (DGAV, 2021), (Figura 1).

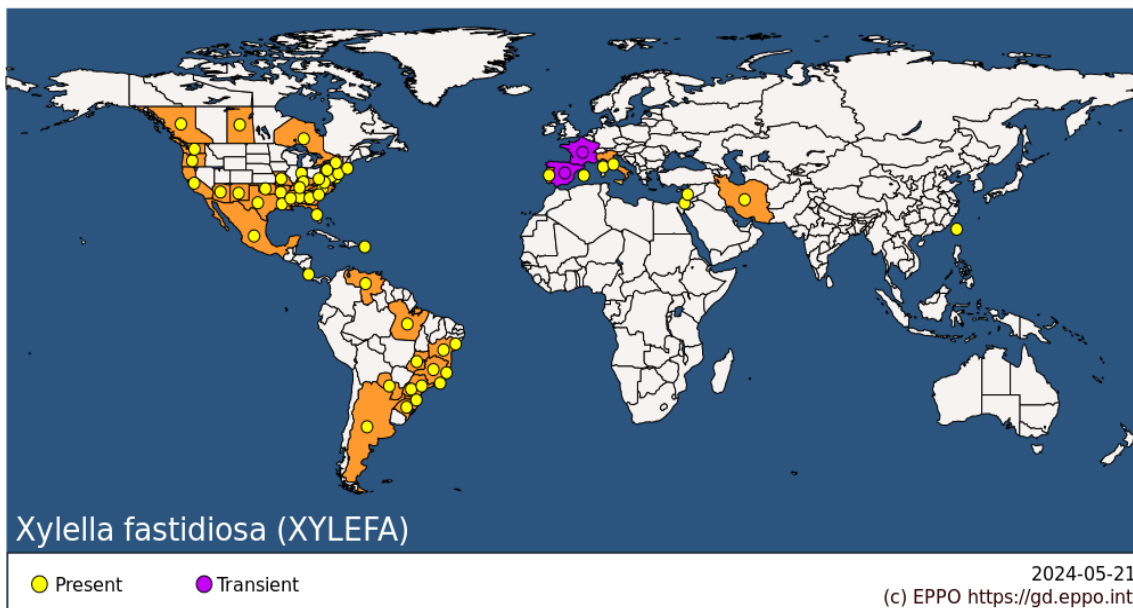


Figura 1. Distribuição mundial da *Xylella Fastidiosa* (EPPO, 2024).

Em Portugal, o primeiro caso oficialmente confirmado ocorreu em janeiro de 2019, em Vila Nova de Gaia, afetando plantas de alfazema (*Lavandula dentata* Linnaeus) (DGAV, 2021). Após a descoberta inicial, uma prospeção intensiva foi realizada, resultando na identificação de mais espécies infectadas. Com cada nova confirmação de foco, para evitar a dispersão e garantir a erradicação da bactéria, é imediatamente estabelecida uma “Zona Demarcada”. Esta área inclui uma “Zona Infetada”, abrangendo todas as plantas suscetíveis num raio de 50 metros, e uma “Zona Tampão”, que circunda o foco de infecção num raio de 2,5 km (Portaria n.º 243/2020). Desde a primeira deteção, as zonas demarcadas foram ampliadas, abrangendo atualmente várias freguesias em onze concelhos no Norte (Despacho DGAV n.º 46/G/2021), três concelhos no Centro (Despacho DGAV n.º 40/2021) e um concelho no Sul (Despacho DGAV n.º 39/2021).

A rápida propagação dessa bactéria para novas localidades é principalmente atribuída ao transporte de material vegetal contaminado. Uma vez introduzida em um novo local, a bactéria se espalha rapidamente por meio de insetos vetores nativos (Redak et al., 2004).

Atualmente, 19.049 amostras foram coletadas na área do Porto, das quais 338 testaram positivo para a bactéria. Em resposta a essas deteções, as autoridades implementaram medidas rigorosas de erradicação, conforme a regulamentação da UE (EPPO 2024).

2.4 Transmissão

A transmissão de *X. fastidiosa* por insetos é singular porque não exige um período de latência, sendo a bactéria transmitida de maneira persistente (Almeida et al., 2005). É suficiente a presença de uma planta infectada por *X. fastidiosa* para que a doença se estabeleça e se dissemine através de insetos vetores entre as plantas. A bactéria ocupa dois habitats distintos: o xilema das plantas e o intestino anterior (estomodeu) dos insetos, que pertencem à subordem Auchenorrhyncha (Redak et al., 2004).

A aquisição da bactéria ocorre quando o inseto se alimenta da seiva bruta de uma planta infectada, momento em que as células bacterianas ficam retidas no aparelho bucal do inseto (Almeida et al., 2005). Tanto as ninfas quanto os adultos, desempenhando o papel de vetores, obtêm a bactéria ao se alimentarem do xilema de uma planta infectada e podem então inoculá-la em plantas saudáveis imediatamente após a aquisição.

Após se alimentarem do xilema de uma planta infectada, os insetos, vetores da *X. fastidiosa*, possuem a capacidade de transmitir imediatamente o patógeno para plantas saudáveis (EPPO, 2019). Este processo de transmissão envolve a adesão da bactéria ao inseto, o qual é diretamente regulado pela expressão do gene *rpfF*, desencadeando a síntese de um fator de sinalização difusível (DSF) (Simionato et al., 2007). Posteriormente, esse DSF, quando detectado por outras células bacterianas, induz a expressão de adesinas (Killiny et al., 2014).

Essas adesinas desempenham um papel fundamental na adesão do patógeno ao inseto e na formação de um biofilme em seu corpo. Segundo Newman et al., bactérias com mutações no gene *rpfF* não conseguem produzir DSF, o que impede a formação de biofilme no inseto vetor, reduzindo assim a capacidade da bactéria de colonizá-lo. Isso resulta em uma redução da transmissibilidade da bactéria (Newman, et al., 2004). Uma vez estabelecidas em um biofilme dentro do inseto, as bactérias conseguem permanecer viáveis. Além disso, tanto as ninfas quanto os adultos podem manter o patógeno por vários meses após a aquisição, possibilitando que o *X. fastidiosa* se dissemine para plantas distantes da infecção original, principalmente por influências antropogênicas. Para alcançar esse objetivo, o *X. fastidiosa* secreta uma quitinase capaz de digerir a superfície interna do intestino anterior do inseto vetor (Killiny, et al 2010). Após a alimentação de um vetor infectado, as bactérias se desprendem da superfície do intestino anterior para entrar no xilema da planta. Conforme observado por Killiny et al., a turbulência causada

pela ingestão é suficiente para parcialmente desagregar o biofilme bacteriano, permitindo que as células livres sejam injetadas na planta.

2.5 Sintomatologia

Os sintomas relacionados à presença de *X. fastidiosa* em plantas abrangem desde associações assintomáticas até a morte da planta. Isto ocorre devido à ampla variedade de hospedeiros afetados pela bactéria, à diversidade de patógenos e, em parte, devido à extensa gama de condições climáticas encontradas nas áreas onde o patógeno está presente.

Em plantas com níveis elevados de infecção, é comum encontrar um grande número de células bacterianas aderidas às paredes dos vasos do xilema, formando biofilmes abundantes (Newman et al., 2003; Petit et al., 2021). Esta proliferação dentro dos vasos do xilema obstrui o transporte de seiva, resultando em sintomas associados à disfunção do sistema vascular.

Portanto, os sintomas incluem queimaduras nas folhas, necrose marginal, desfolha, desenvolvimento irregular, nanismo ou morte (Figura 2) (Rapicavoli et al., 2018). Estes sintomas expressos são altamente variáveis e não específicos de *X. fastidiosa*, podendo ser confundidos com muitos fatores bióticos (por exemplo, outros patógenos) ou estresses abióticos (por exemplo, deficiências de água ou nutrientes), o que pode levar à identificação incorreta da doença (Vos et al., 2019). Além disso, tanto *X. fastidiosa* quanto outros patógenos vegetais dependem de insetos como vetores para se espalhar pelo ecossistema. Ou seja, as interações entre a bactéria e o vetor também são um componente crítico na epidemiologia das doenças causadas por *X. fastidiosa*.



Figura 2. Sintomas produzidos por *Xylella fastidiosa*. A. Doença de Pierce em videira. B. Branqueamento de folhas de cerejeira. C. Doença bacteriana da queimadura das folhas de carvalho. D. Folha de amêndoa descascada. E. Clorose variegada dos cítricos. F. Síndrome da deterioração rápida do azeite. Fotos A, B, DF tiradas em 17 de junho de 2020 em <https://gd.eppo.int/taxon/XYLEFA/photos>. Foto C tomada em 17 de junho de 2020 em <https://www.vasive.org/browse/detail.cfm?imgnum=5427648>.

2.6 Potenciais Vetores

Xylella fastidiosa é transmitida naturalmente de uma planta para outra por insetos vetores da ordem Hemiptera que se alimentam exclusivamente de xilema, principalmente cicadélídeos, afroforídeos e cercopídeos (DGAV, 2022). Na Europa, a maioria dos principais insetos vetores pertence à família Aphrophoridae, que inclui espécies como *P. spumarius*, *P. italosignus* e *N. campestris* (Petit et al., 2021).

Entre esses, *P. spumarius* é considerado o principal vetor europeu da bactéria *X. fastidiosa* devido à sua ampla distribuição e capacidade de transmissão da doença. Estudos indicam que esta espécie de cigarrinha desempenha um papel crucial na disseminação da bactéria em diversas culturas agrícolas, como oliveiras e amendoeiras, contribuindo para a devastação de plantações inteiras na Europa (Purcell & Finlay, 1979; Sfeir, 2018).

Philaenus spumarius

Philaenus spumarius apresenta uma notável variabilidade em sua coloração e padrão, que varia desde o marrom claro ao completamente preto. Esta variação é amplamente distinguível entre as formas claras e as 'melânicas', predominantemente pretas (Figura 3). Assim como todos os membros de sua família, esses insetos possuem dois espinhos robustos na borda externa da tíbia posterior, além de vários espinhos menores na ponta (Harkin e Stewart, 2019).



Figura 3. A e B *Philaenus Spumarius* adulto. Fonte: Amgueddfa Cymru - Museu Nacional do País de Gales.

As ninfas, por sua vez, não exibem marcações e sua coloração varia de um amarelo pálido uniforme ao verde limão nos estágios posteriores (Figura 4) (Harkin e Stewart, 2019).



Figura 4. Ninfa *Philaenus Spumarius*. Fonte: Inaturalist.

São insetos de pequeno porte, medindo aproximadamente entre 5,3 a 6,9 mm de comprimento, e exibem polimorfismo no padrão de coloração dorsal (Figura 5) (Quartau e Borges, 1997; Thompson e Halkka, 1973; Yurtsever, 2000). Possuem dois pares de asas, sendo as dianteiras espessas e opacas, enquanto as posteriores são finas e membranosas. Seus membros são trisegmentados, e apresentam antenas curtas semelhantes a cerdas (Rodrigues, 2010).

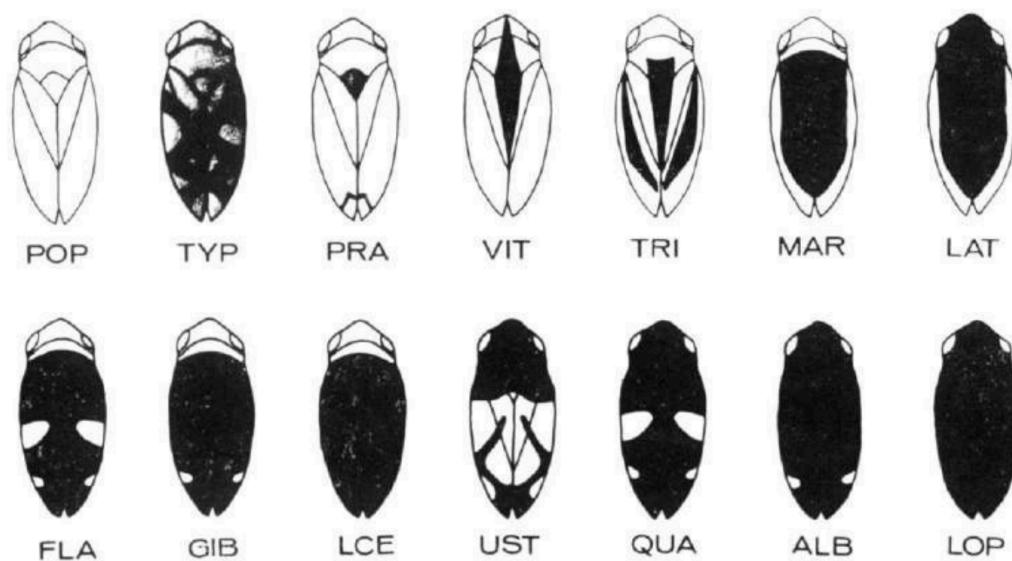


Figura 5. Coloração polimórfica de *Philaenus spumarius*. Linha superior (da esquerda para a direita): populi (pop), typica (typ), praeusta (pra), vittata (vit), trilineata (tri), marginella (mar), lateralis (lat). Linha inferior (da esquerda para a direita): Flavicollis (fla), gibba (gib), leucocephala (lce), ustulata (ust), quadrimaculata (qua), albomaculata (alb), leucophthalma (lop). Fonte: (Thompson e Halkka, 1973).

De acordo com Rodrigues (2010), este inseto da família Aphrophoridae segue um ciclo de vida hemimetabólico, caracterizado por uma metamorfose incompleta. A oviposição ocorre no final do verão, especificamente em setembro, com os ovos entrando em diapausa durante o inverno e eclodindo na primavera. Cada fêmea pode produzir, em média, entre 350 a 400 ovos por postura. As ninfas apresentam uma estrutura semelhante à dos adultos durante todos os cinco estágios de crescimento, até atingirem a fase adulta, quando ocorre o desenvolvimento completo das asas e do sistema reprodutor.

Neophilaenus campestris

Os adultos de *N.campestris* (Figura 6) geralmente possuem entre 5 a 6 mm de comprimento, sendo as fêmeas um pouco maiores que os machos. As ninfas são tipicamente de cor amarelo claro, com manchas escuras distintas nos botões das asas (Harkin e Stewart, 2019).

Neophilaenus campestris é facilmente identificável pelas duas áreas claras ao longo da borda externa das asas, em contraste com um fundo marrom claro. Muitas vezes,

também apresenta uma linha média ligeiramente mais escura que se estende a partir da cabeça (Harkin e Stewart, 2019).



Figura 6. *Neophilaenus campestris* adulto. Fonte: Inaturalist.

2.7 Estratégias de controlo dos vetores

No que diz respeito às medidas de controlo, embora existam alguns estudos a decorrer, ainda não existe um método eficaz de controlo do patógeno aplicável no campo (EFSA 2019), a melhor forma de controlo de *X. fastidiosa* é, portanto, a prevenção da disseminação da bactéria para regiões onde ainda não está presente.

A abordagem para lidar com focos de infecção implica em seguir as medidas de erradicação estabelecidas na legislação, conforme descrito no Enquadramento Legal. Essas medidas se concentram em controlar os insetos vetores e remover as plantas infectadas, que, se permanecerem no local, podem servir como reservatório da bactéria.

Dada a variedade de hospedeiros e insetos vetores, a prevenção requer a realização de ações de monitoramento anual adaptadas às particularidades de cada região, espécies hospedeiras e características dos insetos vetores (DGAV, 2022).

Nesse sentido, a comissão Europeia, regulamentou a partir de 2014, medidas de quarentena (Regulamento (UE) n.º 2016/2031) e medidas fitossanitárias para evitar a introdução e dispersão da bactéria, em território Europeu (Regulamento de Execução (UE) n.º 2020/1201). De forma a assegurar a execução e cumprimento de tais medidas, a autoridade fitossanitária nacional (DGAV), ao abrigo do Dec. Lei n.º 67/2020, de 15 de setembro, estabelece a zona demarcada, as medidas para erradicação da bactéria e as restrições de movimentos de plantas destinadas a plantação na Zona de Infeção e Zona Tampão (Despacho n.º 46/G/2021).

As medidas de quarentena e fitossanitárias são fundamentais como primeira linha de defesa contra a bactéria, mas devem ser complementadas com estratégias adicionais, tais como o emprego de métodos de controlo químico, biológico ou cultural.

As estratégias mais eficazes para controlar *X. fastidiosa* e seus vetores combinam diversos métodos (Purcell, 2009). A implementação de medidas culturais, como o uso de variedades de plantas mais resistentes, a erradicação de ervas daninhas e plantas hospedeiras alternativas, além da remoção de resíduos vegetais em vinhedos e áreas adjacentes para reduzir a população de insetos que hibernam; ou a eliminação das folhas inferiores no início da temporada, quando a maioria dos ovos já foi posta, efetivamente reduz o número de indivíduos e serve como uma primeira linha de defesa contra a infestação de cigarrinhas (Creasy & Creasy, 2009; Mani et al., 2014).

Portugal apresenta diversos fatores de risco que favorecem a entrada desta bactéria, incluindo sua localização geográfica, clima mediterrânico, a presença de possíveis vetores e a prevalência de plantas hospedeiras (Sá-Pereira, 2019). Por essa razão, é crucial direcionar todos os esforços para a prevenção, o que é essencial para o futuro das culturas e da economia. Uma vez que a doença se propaga por meio de insetos vetores, é de suma importância quantificar a dispersão desses insetos, identificar as áreas de risco e controlá-los, especialmente em seus estágios ninfais, antes de alcançarem a fase adulta.

2.8 Modelo baseado em graus-dia para prever a eclosão de ovos de *P. spumarius* e *N. campestris*

Os insetos necessitam de quantidades específicas de calor acumulado, expressas em unidades de calor (HU), para alcançar determinados estágios de desenvolvimento, que são comumente definidos em termos de graus-dia de crescimento (GDD) (também conhecidos como graus-dia, unidades de calor ou unidades térmicas) (Herms 2004). Em essência, o GDD representa a medida do calor acumulado ao longo do tempo, com base nas taxas de desenvolvimento dos insetos dentro de intervalos de temperatura entre os limites inferior e superior. Geralmente, a função que descreve a resposta à temperatura exibe uma forma unimodal, com temperaturas mínimas e máximas abaixo ou acima das quais não ocorre desenvolvimento.

Diversos autores estabeleceram relações entre a fenologia e a temperatura de *P. spumarius*. Chmiel e Wilson (1979) determinaram os limiares de temperatura máximo e mínimo para o desenvolvimento ninfal de *P. spumarius* na América, empregando o método do menor coeficiente de variação (CV) conforme descrito por Arnold (1959), e calcularam as unidades de calor (HU) utilizando o método delineado por Sevacherian et al. (1977).

Bodino et al. (2019) determinaram os dias de desenvolvimento (DD) dos estágios ninfais nas regiões da Apúlia e da Ligúria, na Itália, com base no número de horas durante o ano em que a temperatura excedeu o mínimo de 8°C. Essa temperatura mínima foi derivada de experimentos conduzidos em temperaturas fixas (dados não divulgados). Posteriormente, Beal et al. (2021) adaptaram a fórmula obtendo resultados semelhantes.

Embora ambos os estudos contribuam para uma compreensão mais profunda da relação entre a fenologia do desenvolvimento ninfal e a temperatura, ainda falta uma ferramenta de previsão que possa antecipar a eclosão dos ovos e determinar o momento ideal para implementar medidas de controle.

Capítulo 3

Materiais e métodos



3. Material e métodos

3.1 Obtenção de insetos e posturas

No final de outubro de 2023, indivíduos adultos das espécies *P. spumarius* e *N. campestris* foram capturados num olival localizado em Bragança (41°48'08"N 6°44'57"W), utilizando uma rede entomológica de varrimento no coberto vegetal. Os indivíduos capturados foram transferidos para caixas de criação (dimensões: 42 x 41 x 42 cm) contendo plantas de *Medicago sativa*. Em cada caixa foi colocado um elevado número de insetos, assegurando uma proporção significativa de machos e fêmeas, com o objetivo de promover o acasalamento. Cada caixa foi devidamente identificada com a espécie do inseto e a data de captura. Posteriormente, as caixas foram colocadas em câmaras aclimatizadas, mantidas a uma temperatura de 21°C, humidade relativa de 50%, e um fotoperíodo de 16 horas de luz para 8 horas de escuridão.

Para facilitar a oviposição, foram colocadas agulhas de pinheiro secas no fundo das caixas de cria. Semanalmente, entre 02/10/2023 e 02/11/2023, as agulhas de pinheiro foram observadas sob uma lupa binocular para presença de posturas (Figura 7). Quando se observava a existência de posturas, procedia-se à contagem do número de ovos por postura. No total, foram contabilizados 662 ovos de *P. spumarius* e 203 ovos de *N. campestris*, distribuídos por três datas distintas de oviposição. Os períodos de oviposição observados foram: i) 02/11/2023, ii) 06/11/2023 e iii) 13/11/2023.



Figura 7. Agulha de pinheiro com posturas de *P. spumarius*.

3.2 Desenho experimental

As massas de ovos de cada data de oviposição obtidas conforme descrito na secção 3.1 foram divididos em cinco partes iguais, e cada parte foi transferida para um local de campo em cinco locais diferentes, quatro deles a diferentes altitudes, e dois a mesma altitude, mas um em condições controladas de estufa. Os cinco locais utilizados para o estudo de campo consistiam em ambientes naturais distintos localizados no norte de Portugal. Esses locais foram seleccionados em diferentes altitudes para fornecer um gradiente nas condições climáticas: (1) Bragança em condições de estufa com

temperatura controlada (25 °C 60% Hr) (674 m) (coordenadas: 41°47'50"N, 6°46'03" W); (2) Bragança em condições de semicampo (674 m) (coordenadas: (41°47'50"N, 6°46'03" W); (3) Mirandela (514 m) (coordenadas: 41°28'41"N, 7°10'40"W); (4) Cova da Lua (862m) (coordenadas: 41°53'20"N, 6°49'19"W) e (5) Fragoso (174 m) (coordenadas 41°36'38"N, 8°42'12"W).

Em cada local foi colocado uma caixa de microcosmo de 43,5 cm de diâmetro e 50 cm de altura (Figura 8). Em cada microcosmo foram colocados seis vasos contendo plantas de *Medicago Sativa* para alimentação das ninfas recém nascidas após emergência. Como havia três datas de oviposição e duas espécies, as massas de ovos foram divididas igualmente e distribuídas nos vasos onde as agulhas de pinheiro contendo as massas de ovos foram colocadas (Figura 9).



Figura 8. Microcosmo em ambiente de semicampo.

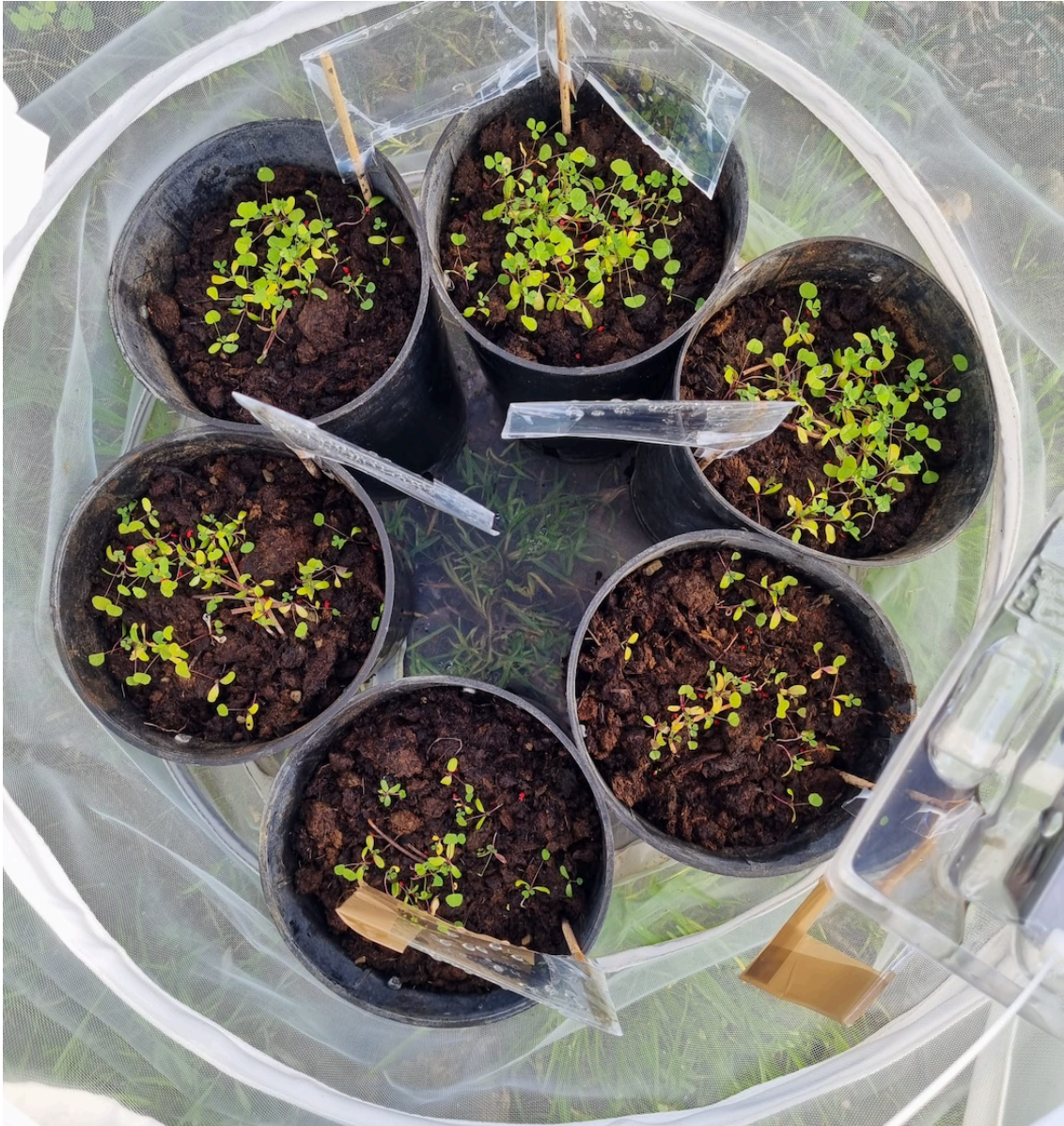


Figura 9. Interior do microcosmo em ambiente de semicampo.

Os vasos nos microcosmos foram observados semanalmente para registrar a eclosão das ninfas recém eclodidas. As ninfas emergidas foram removidas das plantas para facilitar futuras observações. Todas as plantas foram inspecionadas e registadas semanalmente até que nenhuma ninfa fosse observada por duas semanas. A temperatura e a humidade foram monitorizados diariamente em cada local de campo com dataloguers (Rotronic, PST Process sensing technologies) inseridos no interior dos microcosmos, durante toda a duração do experimento.

Capítulo 4

Resultados



4. Resultados

4.1 Emergência ninfal e oviposição

Um total de 99 ninfas de *P. spumarius* e 38 ninfas de *N. campestris* foram registadas nos ensaios de campo realizados nos cinco locais experimentais. A primeira emergência de ninfas de ambas as espécies foi observada em 29 de dezembro de 2023, em Bragança, sob condições controladas de estufa, enquanto a última detecção ocorreu em 5 de abril de 2024, nas condições meteorológicas da Cova da Lua. No geral, o período de emergência das ninfas variou entre os locais, estendendo-se por aproximadamente quatro meses. A análise dos dados de emergência por local evidenciou uma elevada aleatoriedade no processo de eclosão, resultando em variações nas datas de emergência, mesmo para ovos submetidos às mesmas condições ambientais. Essa variabilidade também foi refletida nas datas de oviposição, que se distribuíram por longos intervalos temporais.

4.2 Emergência ninfal e oviposição de Bragança em condições controladas de estufa

De acordo com a Figura 10a, *P. spumarius* apresenta uma emergência prolongada distribuída ao longo do tempo, enquanto *N. campestris* (Figura 10b) exibe um padrão de emergência mais concentrado e com pico acentuado em um curto período de tempo.

Os resultados referentes à emergência de ninfas de *P. spumarius* demonstram variações nas datas de eclosão dependendo da data de oviposição. Para os ovos postos em 02/11/2023, a emergência das primeiras ninfas foi registrada em 29/12/2023, com um pico inicial de duas ninfas emergentes, seguido por uma segunda emergência menor em 12/01/2024. Na segunda data de oviposição (06/11/2023), as primeiras ninfas emergiram também em 29/12/2023, com um total de quatro emergências registradas até o final do período de observação, em 05/04/2024. Para a terceira data de oviposição (13/11/2023), não houve emergência de ninfas ao longo do período estudado. No total, de 58 ovos coletados em cada data de oviposição, apenas cinco ninfas emergiram na primeira data, quatro na segunda, e nenhuma na terceira.

Em contraste, os resultados mostram variações nas emergências de *N. campestris* conforme a data de oviposição. Para os ovos postos em 02/11/2023, as primeiras ninfas emergiram em 29/12/2023 (2 emergências), com mais uma emergência ocorrendo no dia

05/01/2024. Na segunda data de oviposição (06/11/2023), não houve emergência de ninfas durante o período de observação. Já para os ovos postos em 13/11/2023, duas ninfas emergiram, uma em 19/01/2024 e outra em 02/02/2024. No total, das posturas de *N. campestris*, três ninfas emergiram da primeira data de oviposição, nenhuma da segunda, e duas ninfas na terceira data.

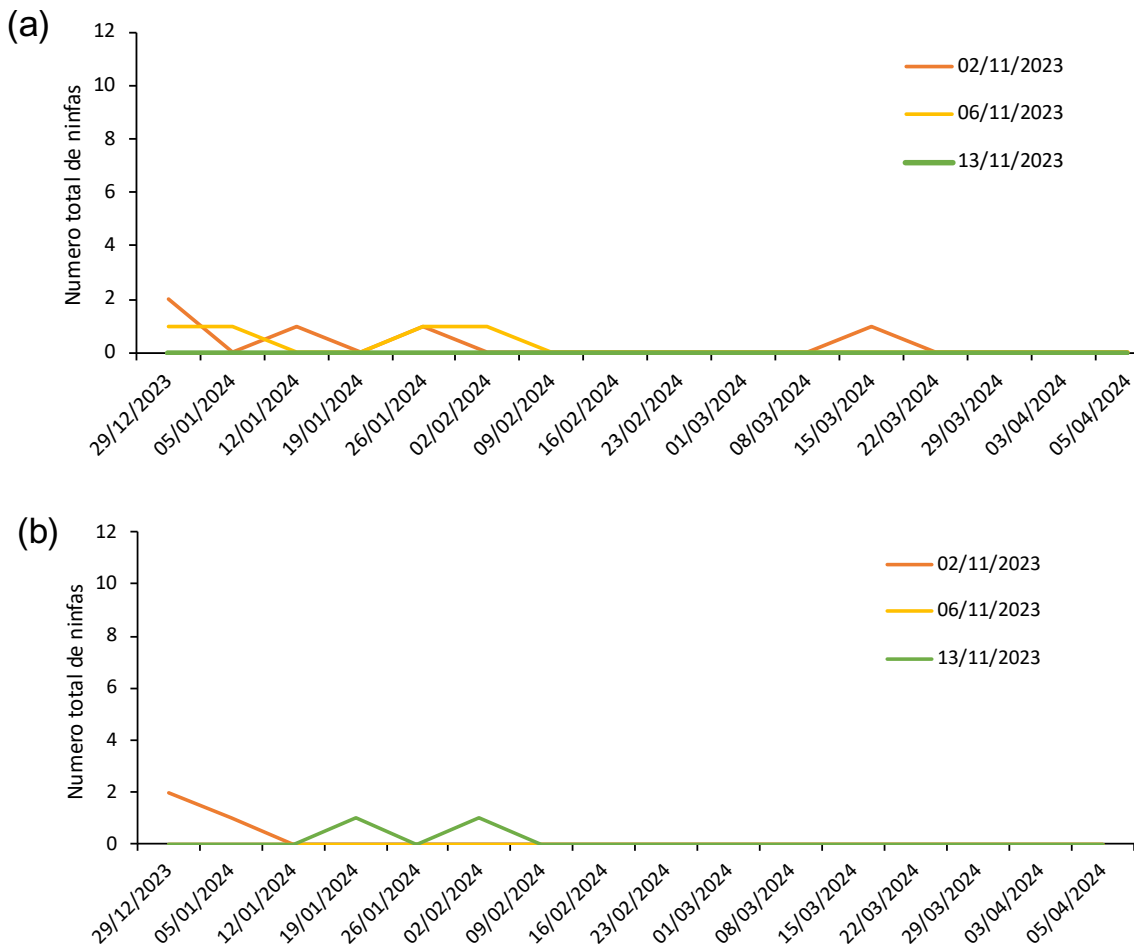


Figura 10. Número total de ninfas emergidas de (a) *Philaenus spumarius* e (b) *Neophilaenus campestris* por data de observação em condições controladas de estufa.

Na Figura 11, é possível observar a variação da temperatura e da humidade ao longo do tempo, conforme registrado por um dataloguer. Observa-se que a temperatura média se mantém relativamente estável, em torno de 25°C, com variações entre a temperatura mínima e a máxima, que oscilam de forma mais acentuada, com picos que ultrapassam

os 40°C em alguns períodos. A humidade média situa-se em torno de 30%, com variações que indicam uma amplitude estável, flutuando entre cerca de 20% e 45%.

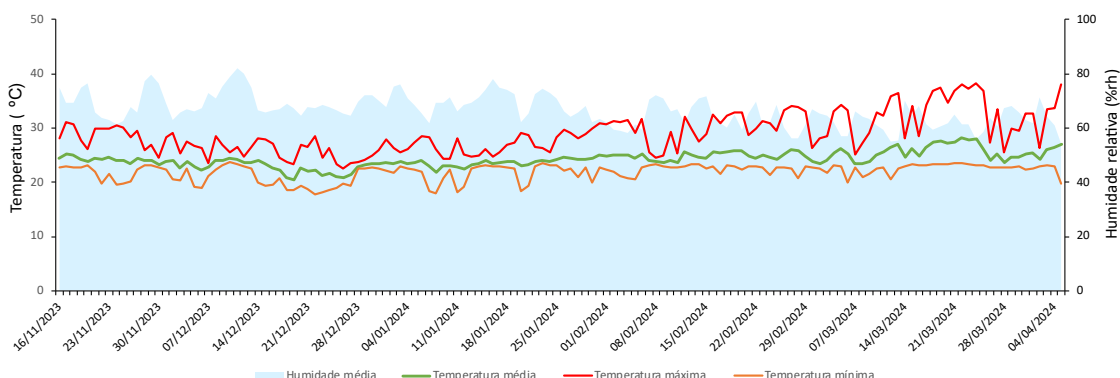


Figura 11. Dados meteorológicos de Bragança em condições controladas de estufa.

4.3 Emergência ninfal e oviposição de Bragança em condições de semicampo

Em condições de semi-campo, onde a temperatura e humidade não foi controlada, verificou-se que as ninfas de *P. spumarius* (Figura 12a), eclodiram mariotariamente nas primeiras semanas de fevereiro de 2024. Para os ovos postos em 02/11/2023 a emergência da primeira ninfa foi em 16/02/2024, seguido por uma segunda emergência em 23/02/2023 (três ninfas). Na segunda data de oviposição (06/11/2023) só se verificou emergência de ninfas na terceira semana de fevereiro. Para a terceira data de oviposição (13/11/2023), foram registradas a emergência de 5 ninfas sendo cinco delas no dia 23/02/24 e mais três na semana seguinte, 01/03/24.

No caso de *N. campestris* (Figura 12b), o padrão de emergência de ninfas é menos intenso em comparação com *P. spumarius*. Para as posturas de 02/11/2023 e 06/11/2023 não foram registradas emergências. Uma única ninfa foi observada ao longo do período de estudo, nos ovos postos em 13/11/2023 na data de 23/02/2024.

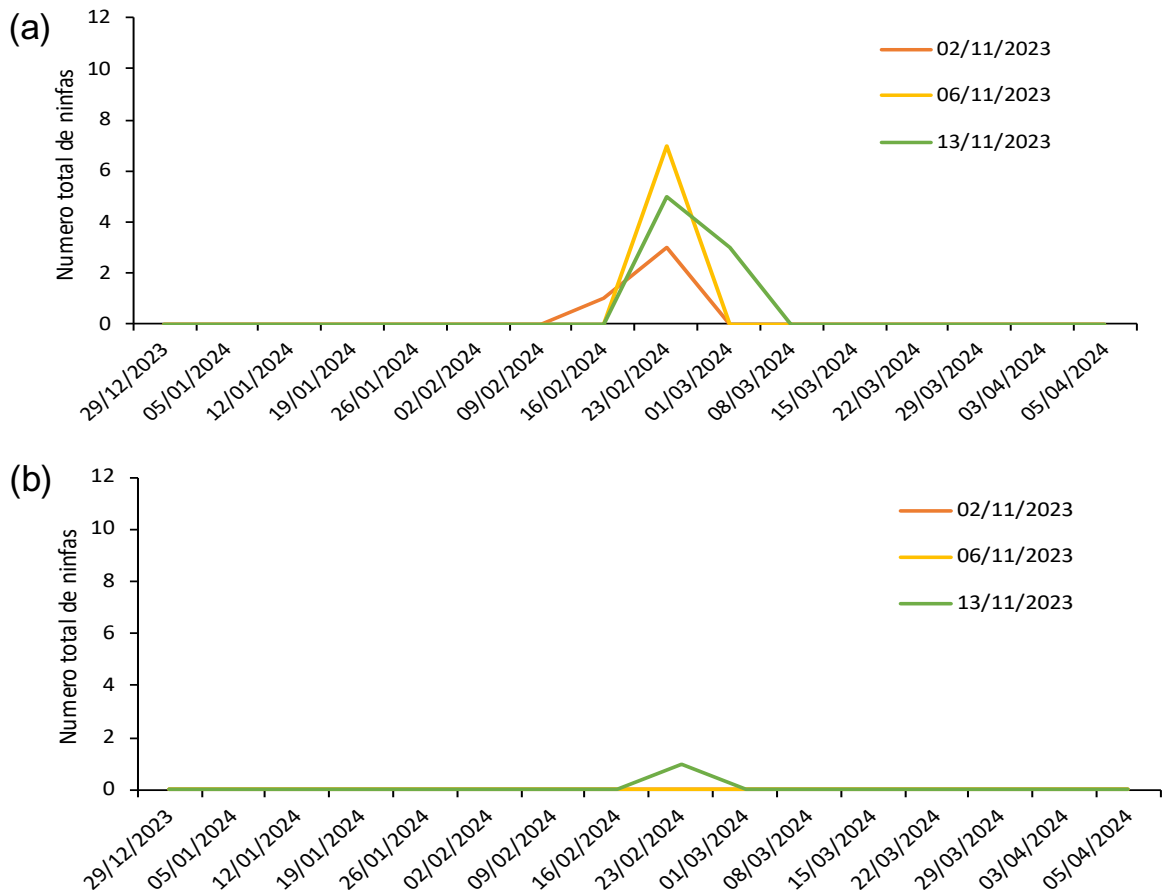


Figura 12. Número total de ninfas emergidas de (a) *Philaenus spumarius* (b) *Neophilaenus campestris* por data de observação em condições de semicampo.

Com relação aos dados meteorológicos, a Figura 13 exibe variações de temperatura e humidade ao longo do tempo. Observa-se que a temperatura média se mantém relativamente estável em torno de 15°C durante grande parte do período, com oscilações mais acentuadas entre a temperatura mínima e a máxima. A temperatura máxima atinge picos que ultrapassam os 30°C em alguns dias, enquanto a mínima chega a valores próximos de 0°C, especialmente no mês de dezembro. Já a humidade média situa-se em torno de 80%, apresentando variações significativas, com picos que chegam a 100%, sugerindo a influência de condições atmosféricas úmidas, intercaladas com períodos de menor humidade

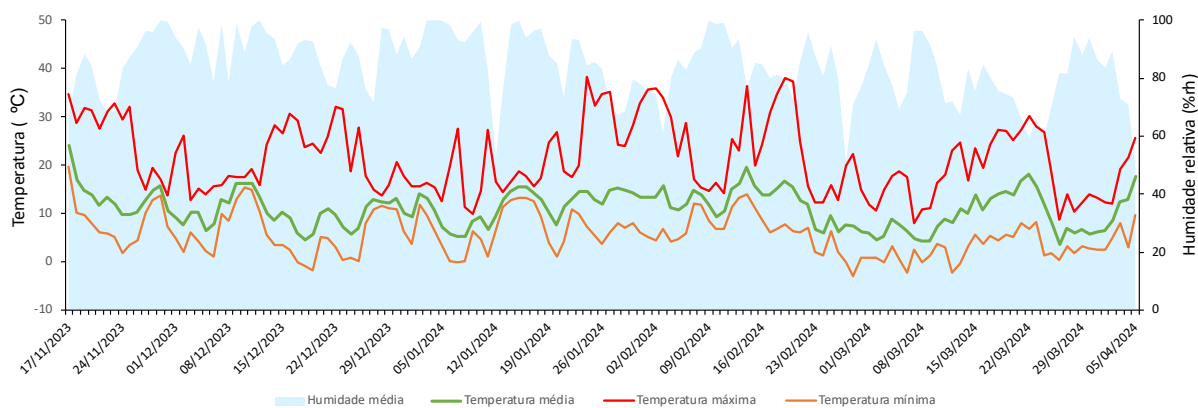


Figura 13. Dados meteorológicos de Bragança em condições de semicampo.

4.4 Emergência ninfal e oviposição de *Mirandela*

Na Figura 14a, observa-se um pico de emergência no início de fevereiro. Para os ovos postos em 02/11/23 foram registradas seis emergências em 09/02/23, seguida por um aumento de sete emergências em 08/03/24, reduzindo para somente uma em 29/03/24. Para os ovos postos em 06/11/23, foram registradas doze emergências em 09/02/24 seguida por um decréscimo de cinco emergências em 08/03/24 e duas no dia 15/03/24. Para os ovos postos em 13/11/23, foram registradas um pico de sete emergências em 09/02/24, seguida por mais quatro sendo duas na data de 08/03/24 e outras duas em 29/03/24.

No total, de 58 ovos coletados em cada data de oviposição, quinze ninfas emergiram na primeira data, dezenove na segunda, e onze na terceira.

Em contraste, as emergências de *N. campestris* (Figura 14b) foram menores e mais tardias tendo, para os ovos postos em 02/11/23 três emergências em 08/03/2024 seguida por mais duas, sendo uma na semana seguinte (15/03/24) e a última no fim de março. Para os ovos postos em 06/11/23, foi registrada uma queda de posturas, tendo uma no dia 09/02/24, outra no dia 08/03/24 e uma última na data de 29/03/24, totalizando três posturas. Para a última data, ovos postos em 13/11/23 foram registradas três posturas em uma única data (29/03/24).

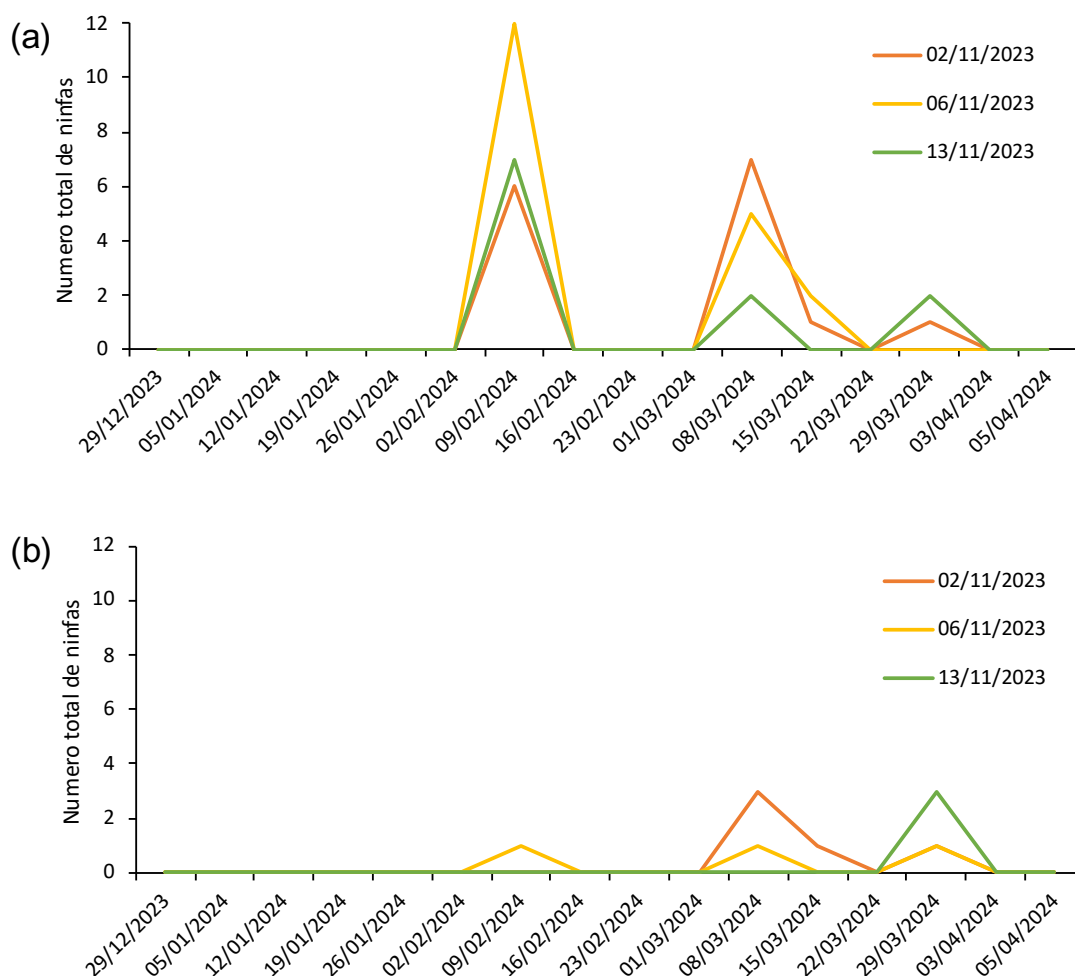


Figura 14. Número total de ninfas emergidas de (a) *Philaenus spumarius* e (b) *Neophilaenus campestris* por data de observação em condições de semicampo.

Em relação aos dados meteorológicos, a Figura 15 exibe variações de temperatura e humidade ao longo do tempo. Observa-se que a temperatura média (linha verde) oscila em torno de 10°C durante o período analisado, com as temperaturas máximas (linha vermelha) atingindo picos de até 40°C em dias específicos, e as mínimas (linha laranja) caindo para valores próximos ou abaixo de 0°C, em especial no final de dezembro e início de janeiro. A humidade relativa média (área azul) se mantém elevada, com uma média em torno de 80%, apresentando picos que frequentemente alcançam 100%, indicando a presença de altos níveis de humidade no ambiente.

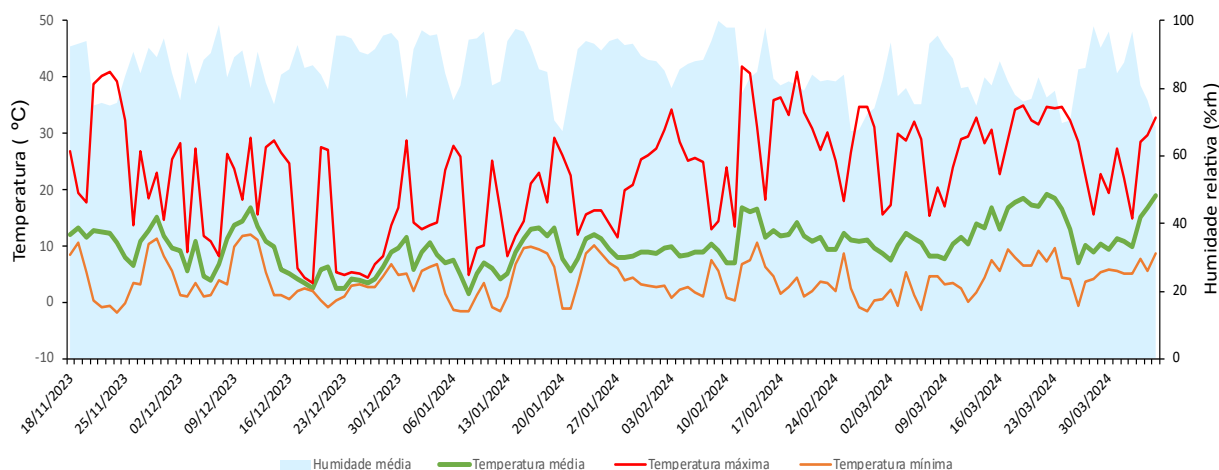


Figura 15. Dados meteorológicos de Mirandela.

4.5 Emergência ninfal e oviposição de Cova da Lua em condições de semicampo

A emergência de ninfas de *P. spumarius* (Figura 16 a) em Cova de Lua iniciou em 15/03/2024, para as três datas de oviposição estudadas: 02/11/2023, 06/11/2023 e 13/11/2023. A maior parte das emergências ocorreu na data de oviposição mais antiga (02/11/2023), com um total de 13 ninfas emergentes ao longo de todo o período de monitoramento. O pico de emergência ocorreu entre 15/03/2024 e 22/03/2024, onde dez ninfas emergiram em 15/03 e outras duas em 22/03. Para a segunda data de oviposição (06/11/2023), as emergências foram menores, totalizando sete ninfas, sendo a maioria (6) emergente também em 15/03/2024. A terceira data de oviposição (13/11/2023) não registrou emergências ao longo do período.

A emergências de *N. campestris* (Figura 16b) em Cova de Lua mostram um padrão ligeiramente diferente. A emergência começou no mesmo período, com as primeiras ninfas aparecendo em 15/03/2024, mas com números menores em comparação com *P. spumarius*. Para a primeira data de oviposição (02/11/2023), um total de 13 ninfas emergiram, com 11 emergências registradas em 15/03/2024, seguidas por mais duas sendo uma em 22/03/2024 e outra em 05/04/24. Para a segunda data de oviposição (06/11/2023), seis ninfas emergiram, com um pico também em 15/03/2024 (5 emergências). Para a terceira data (13/11/2023), apenas uma ninfa emergiu, também em 22/03/2024.

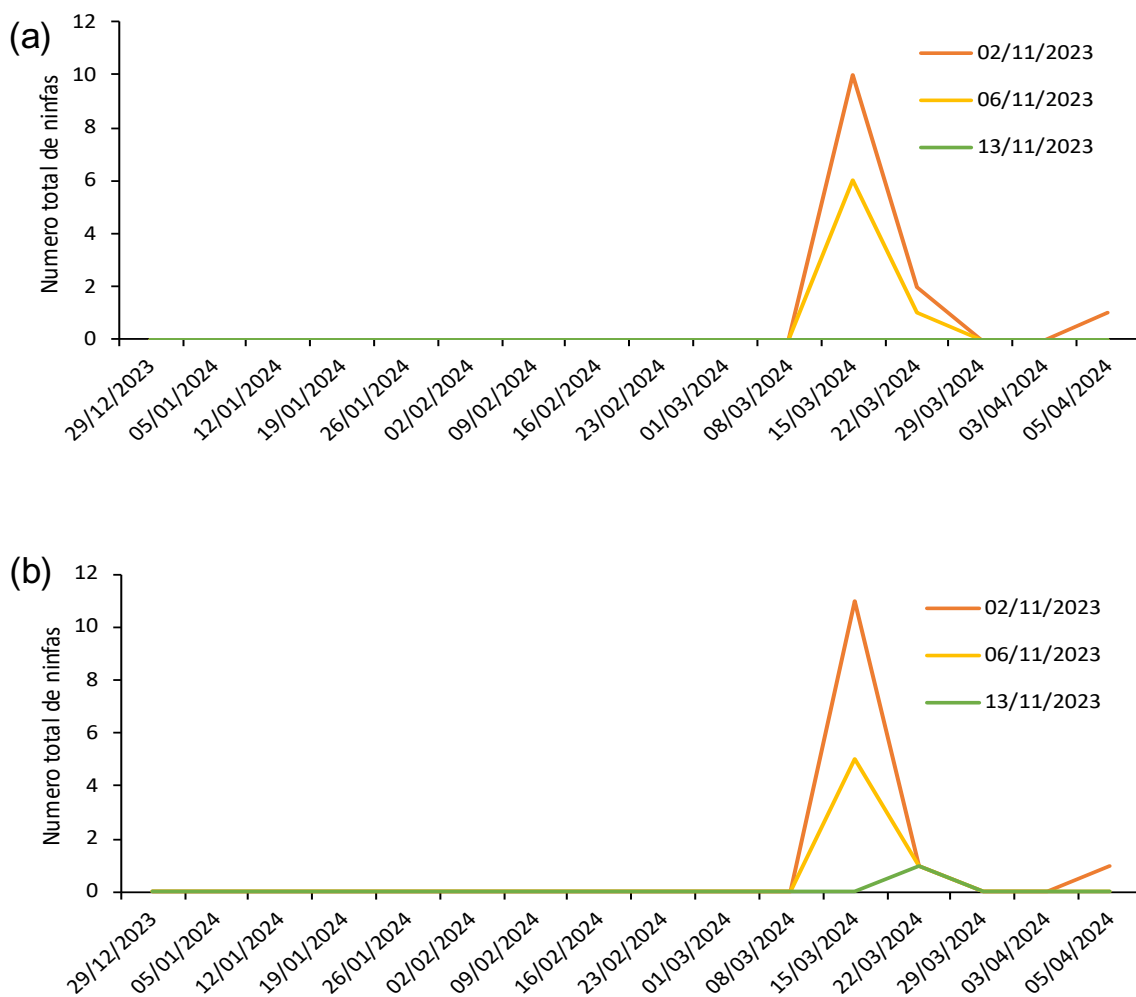


Figura 16. Número total de ninfas emergidas de (a) *Philaenus spumarius* e (b) *Neophilaenus campestris* por data de observação em condições de semicampo.

Em relação aos dados meteorológicos, a Figura 17 exibe as variações de temperatura e humidade ao longo do tempo, conforme registrado por um dataloguer. A temperatura média (linha verde) oscila em torno de 8 °C durante o período analisado, com temperaturas máximas (linha vermelha) atingindo picos de até 19,5 °C em dias específicos, enquanto as mínimas (linha laranja) caem para valores próximos de -2,8 °C, especialmente no final de dezembro e início de janeiro. A humidade relativa média (área azul) se mantém elevada, com uma média em torno de 95%, apresentando picos que frequentemente alcançam 100%, indicando a presença de altos níveis de humidade no ambiente, o que pode influenciar diretamente o conforto térmico e a atividade biológica na região.

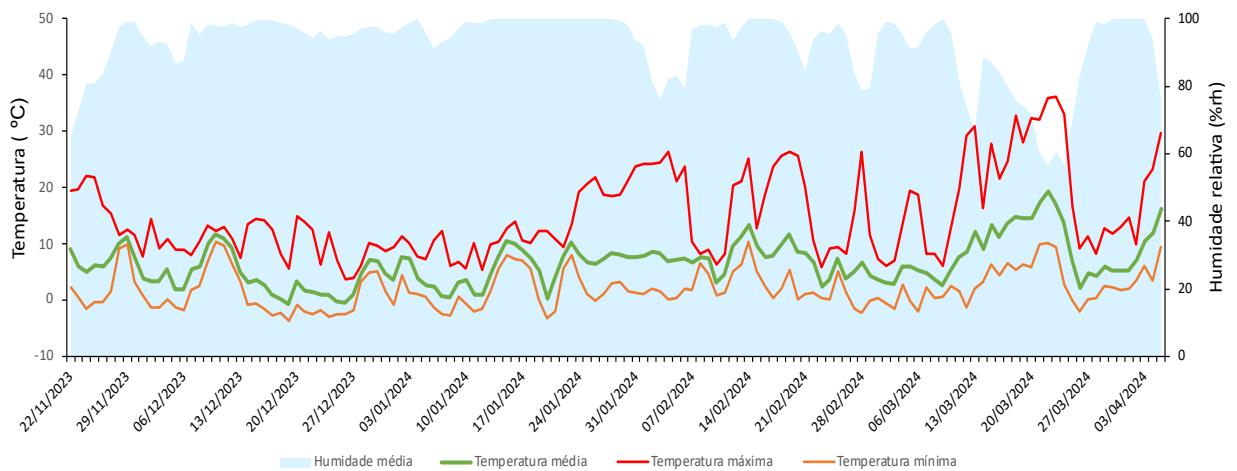


Figura 17. Dados meteorológicos de Cova de lua.

4.6 Emergência ninfal e oviposição de *Fragoso* em condições de semicampo

A emergência de ninfas de *P. spumarius* (Figura 18a) em três datas de oviposição (02/11/2023, 06/11/2023 e 13/11/2023). Observa-se que a maior emergência ocorreu a partir da postura realizada em 02/11/2023, com um pico significativo de quatro ninfas emergindo, sendo duas na data de 09/02/24 e outras duas na semana seguinte (16/02/24). Para a postura feita em 06/11/2023, não foram registradas emergências, enquanto a terceira data de oviposição, em 13/11/2023, houveram duas emergências registradas na data de 01/03/24.

Em contrapartida, a emergência de ninfas de *N. campestris* (Figura 18b) mostra que, foram registrados somente uma emergência para os ovos da segunda data de oviposição 06/11/23 na data de 01/03/24.

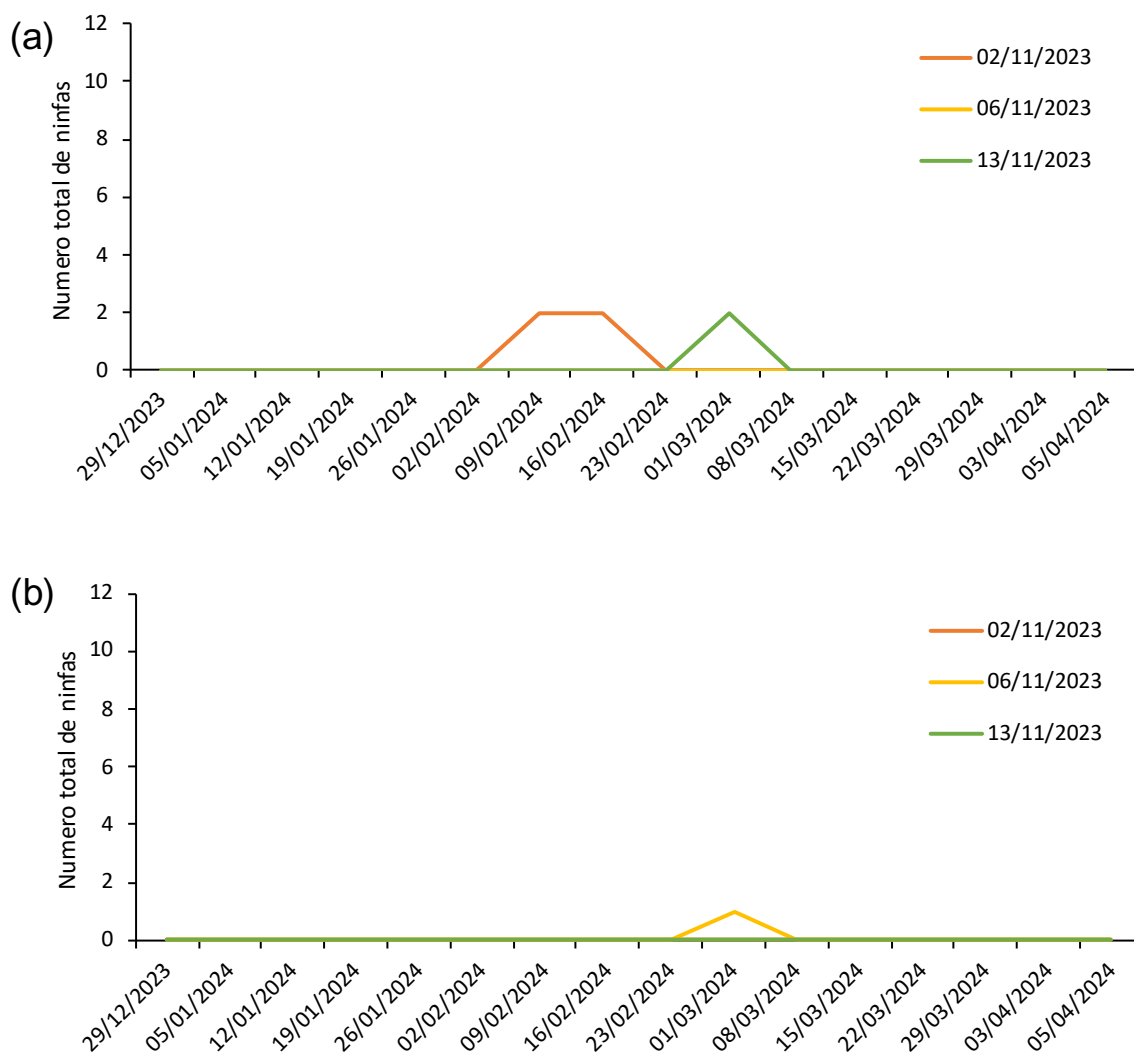


Figura 18. Número total de ninfas emergidas de (a) *Philaenus spumarius* e (b) *Neophilaenus campestris* por data de observação em condições de semicampo.

Em relação aos dados meteorológicos, a Figura 19 exibe as variações de temperatura e humidade ao longo do tempo, conforme registrado por um dataloguer. A temperatura média (linha verde) oscila em torno de 25 °C durante o período analisado, com temperaturas máximas (linha vermelha) atingindo picos de até 45 °C em dias específicos, enquanto as mínimas (linha laranja) caem para valores próximos de 15 °C, especialmente no final de dezembro e início de janeiro. A umidade relativa média (área azul) varia consideravelmente, com valores médios em torno de 50%, apresentando picos de até 100% em dias de maior umidade e queda significativa durante períodos de calor intenso.

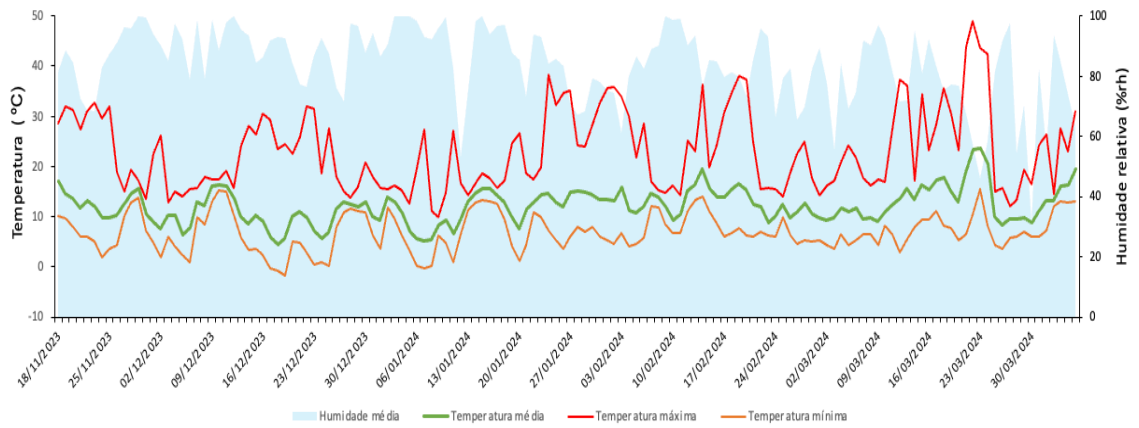


Figura 19. Dados meteorológicos de Frago.

Capítulo 5

Discussão



5. Discussão

O presente estudo forneceu resultados comparativos em termos de emergência de ninfas de *P. spumarius* e *N. campestris* em diferentes locais e condições ambientais, considerando principalmente variações de temperatura e humidade.

Em Bragança, sob condições controladas de estufa, onde as temperaturas eram mantidas em torno de 25°C e a humidade relativa oscilava entre 30-45%, notou-se uma emergência antecipada de ninfas de *P. spumarius*. Estes resultados estão de acordo com a bibliografia existente que indicam que temperaturas estáveis e elevadas aceleram o crescimento de ovos desta espécie (Bodino et al., 2019). O pico inicial de emergência aconteceu em janeiro de 2024, persistindo até abril. O ambiente de estufa otimizado permitiu uma janela de eclosão extensa, o que pode ser aproveitado na gestão populacional desta espécie, já que as ações de controlo devem ser implementadas durante o período de maior eclosão. Em contrapartida, *N. campestris* apresentou uma emergência mais discreta e tardia, apresentando um pequeno pico em janeiro. Essa variação indica que *N. campestris* pode não se adaptar tão prontamente a condições artificiais constantes, o que está em concordância com pesquisas que apontam que a espécie se adapta melhor a mudanças ambientais, preferindo flutuações de temperatura que remetam a condições naturais (Morente et al., 2021).

Em condições de semicampo, com temperatura média variando entre 15°C e 30°C, as ninfas de *P. spumarius* desenvolveram-se majoritariamente em fevereiro. O que está de acordo com as condições naturais de campo (observações pessoais feitas por Kupicki, 2024) As flutuações de temperatura atrasaram o crescimento em comparação à estufa, contudo, a emergência ocorreu em um intervalo de tempo breve. Este padrão indica que *P. spumarius* tem a capacidade de adaptar seu ciclo de vida às condições climáticas, contudo, a eclosão é impulsionada principalmente pelo aumento das temperaturas (Beal et al., 2021). *Neophilaenus campestris* também mostrou um surgimento mais tardio e disperso neste local, corroborando a noção de que as variações de temperatura afetam de maneira mais significativa o seu ciclo de vida. Lago et al. (2023) notaram esse comportamento, ressaltando a maior sensibilidade de *N. campestris* a ambientes de semicampo, em contraste com *P. spumarius*.

Em Mirandela, com médias de temperatura ligeiramente inferiores às de Bragança e variações de temperatura mais acentuadas, identificou-se um padrão semelhante de emergência para *P. spumarius*, atingindo seu ápice em fevereiro e março de 2024. As

baixas temperaturas mínimas registadas durante o inverno influenciaram o ciclo de desenvolvimento, atrasando a eclosão. O clima mais frio de Mirandela sugerem que *P. spumarius* se adapta melhor a diversas condições climáticas, apesar de seu ciclo de crescimento ser mais previsível com o aumento progressivo da temperatura (Hermes, 2004). No caso de *N. campestris*, foram mais tardias e restritas. As temperaturas baixas em Mirandela parecem ter limitado seu crescimento, o que está em concordância com Bodino et al. (2020), que confirmaram que esta espécie possui um limiar de temperatura mais alto para a eclosão.

O local Cova da Lua exibiu as condições mais severas, apresentando uma média de temperatura de 8°C e variações de -2,8°C a 19,5°C. Neste local, ambas as espécies apresentaram emergências mais tardias. *Philaenus spumarius* apresentou um pico de emergência em março de 2024, com a maior parte das ninfas emergindo apenas quando as temperaturas começaram a aumentar. Esses resultados sugerem que, em altitudes superiores, o desenvolvimento embrionário de *P. spumarius* é consideravelmente atrasado, e as ninfas só surgem após um aquecimento prolongado, confirmando as descobertas de Beal et al. (2021) acerca da necessidade de graus-dia para a eclosão. Para *N. campestris*, as ocorrências de emergência foram ainda mais escassas, apresentando uma taxa de êxito reduzida. As baixas temperaturas na Cova da Lua parecem afetar mais severamente o seu desenvolvimento, confirmando sua maior vulnerabilidade a condições climáticas frias (Bodino et al., 2019).

Em Fragoso, a menor altitude estudada, apresentou temperaturas médias mais amenas (12°C), com picos de até 28°C. No entanto, somente sete ninfas emergiram devido ao possível ataque de forficulas que foram observadas dentro dos microcosmos.

Capítulo 6

Conclusão e perspectivas futuras



6. Conclusão e perspectivas futuras

O primeiro passo para implementação de medidas de controlo contra pragas e insetos vetores é conhecer a sua abundância e diversidade nos ecossistemas agrários. O presente trabalho permitiu entender como as condições ambientais, especialmente a temperatura e a humidade, afetam de forma relevante a emergência das ninfas de *P. spumarius* e *N. campestris*, dois importantes vetores de *X. fastidiosa*.

No presente trabalho foram realizadas observações em diferentes locais e condições climáticas, resultando na identificação de variações significativas no ciclo de vida dessas espécies.

Philaenus spumarius, considerado o principal vetor de *X. fastidiosa* na Europa, apresentou uma maior capacidade de adaptação a variações ambientais, com um ciclo de eclosão mais rápido e concentrado em condições de estufa, onde as temperaturas mais elevadas aceleraram o desenvolvimento.

Neophilaenus campestris, em contraste, mostrou-se mais sensível a flutuações climáticas, com emergências ninfais mais tardias e fragmentadas, o que sugere uma dependência maior de condições ambientais estáveis.

É crucial aprofundar a compreensão da influência dos fatores ambientais no ciclo de vida de *P. spumarius* e *N. campestris*. Estudos adicionais devem focar-se em como as variações climáticas, como a temperatura e a humidade, moldam o desenvolvimento desses insetos em diferentes altitudes e regiões, tal como foi evidenciado neste trabalho, onde as emergências das ninfas variaram significativamente de acordo com os microclimas de cada local amostrado.

O desenvolvimento de modelos preditivos baseados em graus-dia tem demonstrado ser uma ferramenta promissora na previsão de eclosão das ninfas de *P. spumarius* e *N. campestris*. Futuras pesquisas devem continuar a ajustar esses modelos para regiões específicas, levando em consideração a sazonalidade e a variação ambiental, o que permitirá uma previsão mais precisa do momento ideal para implementar medidas de controlo, minimizando assim o uso de produtos fitossanitários e favorecendo práticas de controlo mais sustentáveis.

Bibliografia



Almeida, R. P. P., Blua, M. J., Lopes, J. R. S., & Purcell, A. H. (2005). Vector transmission of *Xylella fastidiosa*: Applying fundamental knowledge to generate disease management strategies. *Entomological Society of America*, 98, 775-786. [https://doi.org/10.1603/0013-8746\(2005\)098\[0775:VTOXFA\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1603/0013-8746(2005)098[0775:VTOXFA]2.0.CO;2)

Arnold C, 1959. The determination and significance of the base temperature in a linear heart unit system. *Processo. Sou. Soc. Hortico. Ciências* 74, 430–445.

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. *Meio Ambiente. Entomol.* 50, 467–476.

Bodino, N., Cavalieri, V., Dongiovanni, C., Simonetto, A., Saladini, M. A., Plazio, E., ... & Bosco, D. (2021). Dispersal of *Philaenus spumarius*, vector of *Xylella fastidiosa*, in olive grove and meadow agroecosystems. In *CNIE 2021-Torino* (pp. 113-113). <https://hdl.handle.net/11379/550028>

Despacho n.º 39/2021 da Direção Geral da Alimentação e Veterinária - DGAV (2021). Estabelecimento da Zona Demarcada de Tavira para *Xylella fastidiosa*. Obtido de <https://www.dgav.pt/plantas/conteudo/sanidadevegetal/inspecao fitossanitaria/informacao fitossanitaria/xylella-fastidiosa/>

DGAV (Direção-Geral da Alimentação e Veterinária). (2021). Estabelecimento da Zona Demarcada de Tavira para *Xylella fastidiosa* [Despacho n.º 39/2021]. Obtido de <https://www.dgav.pt/plantas/conteudo/sanidadevegetal/inspecao fitossanitaria/informacao fitossanitaria/xylella-fastidiosa/>

DGAV (Direção-Geral da Alimentação e Veterinária). (2022). Plano de ação para erradicação de *Xylella fastidiosa* e controlo dos seus vetores. Zona Demarcada da Área Metropolitana do Porto, Lisbon, Portugal. <https://doi.org/10.3390/microbiolres14040108>

DGAV (Direção-Geral da Alimentação e Veterinária). (2023). *Xylella fastidiosa*. Disponível em: <https://www.dgav.pt/plantas/conteudo/sanidade-vegetal/inspecao->

[fitossanitaria/informacao-fitossanitaria/xylella-fastidiosa/](#) (acessado em 25 de março de 2023).

EFSA (European Food Safety Authority). (2013). Statement of EFSA on host plants, entry and spread pathways and risk reduction options for *Xylella fastidiosa* Wells et al. Obtido de http://www.efsa.europa.eu/sites/default/files/scientific_output/files/main_documents/3468.pdf

EFSA (European Food Safety Authority), Gibin, D., Pasinato, L., & Delbianco, A. (2023). Scientific Report on the update of the *Xylella* spp. host plant database – Systematic literature search up to 31 December 2022. EFSA Journal, 21(6), e08061. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2023.8061>

EPPO. (2019). *Xylella fastidiosa* (PM 24/07). Boletim EPPO, 49(2), 175-227. <https://doi.org/10.1111/EPP.12575>.

EPPO. (2024). *Xylella fastidiosa* (PM1/002). Boletim EPPO, 7-20. <https://gd.eppo.int/taxon/XYLEFA/documents>

Gibin, D., Pasinato, L., & Delbianco, A. (2023). Update of the *Xylella* spp. host plant database: Systematic literature search up to 31 December 2022. EFSA Journal, 21, e08061. <https://doi.org/10.1111/epp.12575>.

Halkka O, 1962. Equilibrium Populations of *Philaenus spumarius* L. Nature 193, 93–94.

Helvecio, C. F. D., & Sousa, A. A. (2014). Avanços no conhecimento sobre a clorose variegada dos citros: Uma abordagem sobre os diferentes componentes do patossistema. Citrus Research & Technology, 35(1), 19-33.

Helvecio, R., & Sousa, P. (2014). Microclimatic variations and their impact on agroecological systems in northern Portugal. Journal of Agricultural and Environmental Studies, 15(3), 245-256.

Hermes, D. A. (2004). Using degree-days and plant phenology to predict pest activity. In IPM (Integrated Pest Management) of Midwest Landscapes (pp. 49-59). St. Paul, MN: Minnesota Agricultural Experiment Station Publication.

Hopkins, D. L., & Purcell, A. H. (2002). *Xylella fastidiosa*: Cause of Pierce's Disease of Grapevine and Other Emergent Diseases. *Plant Diseases*, 86(10), 1056-1066. <https://doi.org/10.1094/PDIS.2002.86.10.1056>

Jackson, R. S. (2008). *Wine science: Principles and applications* (3.^a ed.). Elsevier. ISBN: 978-0-12-373646-8

Killiny, N., & Almeida, R. P. P. (2014). Factors affecting the adhesion and retention of the plant pathogen *Xylella fastidiosa* in the foregut of an insect vector. *Applied and Environmental Microbiology*, 80(1), 420-426. <https://doi.org/10.1128/AEM.03156-13>

Killiny, N., Prado, S. S., & Almeida, R. P. P. (2010). Utilization of chitin by the insect-transmitted bacterium *Xylella fastidiosa*. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(18), 6134-6140. <https://doi.org/10.1128/AEM.01036-10>

Lago, C., Cornara, D., Minutillo, S. A., Moreno, A., & Fereres, A. (2022). Comportamento alimentar e mortalidade de *Philaenus spumarius* exposto a inseticidas e seu impacto na transmissão de *Xylella fastidiosa*. *Pest Management Science*, 78(11), 4841-4847. <https://doi.org/10.1002/ps.7105>

Lago, C., Giménez-Romero, À., Morente, M., Matías, M. A., Moreno, A., & Fereres, A. (2023). Modelo baseado em graus-dia para prever a eclosão de ovos de *Philaenus spumarius* (Hemiptera: Aphrophoridae), o principal vetor de *Xylella fastidiosa* na Europa. *Ambiental Entomologia*, 52(3), 350-359. <https://doi.org/10.1093/ee/nvad013>

Morente M, Cornara D, Plaza M, Durán JM, Capiscol C, Trillo R, Ruiz M, Ruz C, Sanjuan S, Pereira JA, Moreno A, Fereres A. Distribution and Relative Abundance of Insect Vectors of *Xylella fastidiosa* in Olive Groves of the Iberian Peninsula. *Insects*. 2018 Dec 1;9(4):175. doi: [10.3390/insects9040175](https://doi.org/10.3390/insects9040175)

Morente, M., Plaza, M., & Fereres, A. (2021). Host plant preferences of spittlebugs (Hemiptera: Aphrophoridae) in olive groves in Spain. *Environmental Entomology*, 50(4), 881-889. <https://doi.org/10.1093/ee/nvaa045>

Neophilaenus campestris (Fallén, 1805): Wilson, M. R., & Turner, J. A. (2021). Insect Vectors of Plant Disease. Amgueddfa Cymru - National Museum Wales. Disponível em <http://insectvectors.science/vector/neophilaenus-campestris> (acessado em 20 de outubro de 2024).

Newman, K. L., Almeida, R. P. P., Purcell, A. H., & Lindow, S. E. (2004). Cell signaling controls *Xylella fastidiosa* interactions with both insects and plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(6), 1737-1742. <https://doi.org/10.1073/PNAS.0308399100>

Nunney, L., Yuan, X., Bromley, R. E., & Stouthamer, R. (2013). Recent evolutionary radiation and host plant specialization in the *Xylella fastidiosa* subspecies native to the United States. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(7), 2189-2200.

Nunney, L., Yuan, X., Bromley, R. E., & Stouthamer, R. (2014). Large-scale intersubspecific recombination in the plant-pathogenic bacterium *Xylella fastidiosa* is associated with the host shift to mulberry. *Applied and Environmental Microbiology*, 80(10), 3025-3033.

Paula, A., Cruz De Carvalho, A., Cruz De Carvalho, G., De Almeida, P., & De Carvalho, C. (2022). Plano de Ação para Erradicação de *Xylella fastidiosa* e Controlo dos seus Vetores no Algarve. *Plant Pathology Journal*, 35, 19-30.

Pereira, S. (2014). *Xylella fastidiosa*, Wells et al. Boletim Técnico INIAV (BT-SAFSV-01).

Petit, G., Bleve, G., Gallo, A., Mita, G., Montanaro, G., Nuzzo, V., Zambonini, D., & Pitacco, A. (2021). Susceptibility to *Xylella fastidiosa* and functional xylem anatomy in *Olea europaea*: Revisiting a tale of plant-pathogen interaction. *AoB Plants*, 13, plab027.

Purcell AH, Saunders SR, Hendson M, Grebus ME, Henry MJ, 1999. Causal role of *Xylella fastidiosa* in oleander leaf scorch disease. *Fitopatologia* 89, 53–58.

Rapicavoli J, Ingel B, Blanco-Ulate B, Cantu D, Roper C, 2018. *Xylella fastidiosa*: an examination of a re-emerging plant pathogen. *Mol. Planta Pathol.* 19, 786–800.

Redak, R. A., Purcell, A. H., Lopes, J. R. S., Blua, M. J., Mizell, R. F., & Andersen, P. C. (2004). The biology of xylem fluid-feeding insect vectors of *Xylella fastidiosa* and their relation to disease epidemiology. *Annual Review of Entomology*, 49(1), 243-270. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.49.061802.123403>

Rodrigues, A. S. B., Silva, S. E., Marabuto, E., Silva, D. N., Wilson, M. R., Thompson, V., Yurtsever, S., Halkka, A., Borges, P. A. V., Quartau, J. A., Paulo, O. S., Seabra, S. G. (2014). New mitochondrial and nuclear evidence support recent demographic expansion and an atypical phylogeographic pattern in the spittlebug *Philaenus spumarius* (Hemiptera, Aphrophoridae). *PLoS One*, 9, 1-12. Doi: 10.1371/journal.pone.0098375

Saponari, Maria & Boscia, D. & Nigro, Franco & Martelli, G.P.. (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. 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. *Phytopathology*, 109, 175-186. Doi:10.1094/PHYTO-08-18-0319-FI

Schaad, N. W., Postnikova, E., Lacy, G., Fatmi, M., & Chang, C. J. (2004). *Xylella fastidiosa* subspecies: *X. fastidiosa* subsp. [correction] *fastidiosa* [correction] subsp. nov., *X. fastidiosa* subsp. *multiplex* subsp. nov., and *X. fastidiosa* subsp. *pauca* subsp. nov. *Systematic and Applied Microbiology*, 27(3), 290-300. <https://doi.org/10.1078/0723-2020-00263>. (Erratum publicado em *Systematic and Applied Microbiology*, 27(6), 763).

Sevacherian, V., Stern, V. M., & Mueller, A. J. (1977). Heat accumulation for timing Lygus control measures in a safflower-cotton complex. *Journal of Economic Entomology*, 70(4), 399-402.

Simionato, AVC; Da Silva, DS; Lambais, MR; Carrilho, E. Caracterização de um suposto fator de sinal difusível de *Xylella fastidiosa* por HRGC-EI-MS. *Journal of Mass Spectrometry* 2007, 42 (4), 490–496. <https://doi.org/10.1002/JMS.1181>

Vivaldi, G. A., Cornara, D., Lucchesi, S., Altiero, E., Terreni, P., & Volani, S. (2022). A survey on *Xylella fastidiosa* vectors and associated host plants in olive groves of the Tavira region, southern Portugal. *Journal of Insect Science*, 22(2), 1-12. <https://doi.org/10.1093/jisesa/ieac040>

Vos, S., Camilleri, M., Diakaki, M., Lázaro, E., Parnell, S., Schenk, M., Schrader, G., & Vicent, A. (2019). Ficha de levantamento de pragas em *Xylella fastidiosa*. Apoio da EFSA. Publicação 16.

Wells, J. M., Raju, B. C., Hung, H. Y., Weisburg, W. G., Mandelco-Paul, L., & Brenner, D. J. (1987). *Xylella fastidiosa* gen. nov., sp. nov.: Gram-negative, xylem-limited, fastidious plant bacteria related to *Xanthomonas* spp. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 37(2), 136-143.

Wilson, D. M. (1961). The central nervous control of flight in a locust. *Journal of Experimental Biology*, 38(2), 471-490.

Yuan, X., Morente, M., Fereres, A., & Giménez-Romero, À. (2010). Multilocus sequence typing of *Xylella fastidiosa* causing Pierce's disease and oleander leaf scorch in the United States. *Phytopathology*, 100, 601-611. doi: 10.1094/PHYTO-100-6-0601. PMID: 20465416.