

PRESENÇA DE *Xylella fastidiosa* EM SEMENTES E MUDAS DE CAFEIEIRO

Marcos Akio YORINORI, IAPAR, Londrina, PR; e-mail: yorinori@sercomtel.com.br;
Alessandra Ferreira RIBAS, IAPAR, Londrina, PR; Caio Katsumi FUNADA, IAPAR,
Londrina, PR; Nelson Sidnei MASSOLA JR., UEL, Londrina, PR; Rui Pereira LEITE JR,
IAPAR, Londrina, PR

RESUMO: A ocorrência de *Xylella fastidiosa* em cafeeiro (*Coffea arabica*) tem sido reportado em diversos estudos. O presente trabalho teve por objetivo determinar a presença de *X. fastidiosa* em sementes e mudas de cafeeiro, bem como a possibilidade de transmissão da bactéria via semente. Foram examinados 12 lotes de sementes de cafeeiro das cultivares IAPAR 59, Catuaí Amarelo, Catuaí Vermelho, Mundo Novo, Acaiaí, Sarchimor Amarelo, Icatu Precoce, Apoatã e IAPAR 75 163-21. O lote 102/C/98 da cultivar IAPAR 59, foi utilizado para produção de mudas visando estudar a transmissão da bactéria via semente. Os testes foram realizados em diferentes estádios de desenvolvimento das plântulas, como palito-de-fósforo, orelha-de-onça, e mudas com 2, 4, 5 e 6 pares de folhas. Também foram examinadas plântulas produzidas em viveiro nesses diferentes estádios de desenvolvimento. Para detectar a bactéria nas amostras foi utilizado o teste serológico de DAS-ELISA. A presença de *X. fastidiosa* foi constatada em oito lotes de sementes das cultivares IAPAR 59, Catuaí Vermelho, Mundo Novo, Acaiaí e Sarchimor Amarelo. Nas mudas produzidas a partir de lote de sementes naturalmente infectadas não foi detectada a presença da bactéria *X. fastidiosa* em todos os estádios de desenvolvimento examinados. Para as mudas de viveiro, plântulas com 3, 4 e 6 pares de folhas apresentaram resultado positivo para presença de *X. fastidiosa*. Este resultado indica que a infecção de cafeeiro por *X. fastidiosa* pode ocorrer logo nos primeiros estádios de desenvolvimento das plantas.

PALAVRAS-CHAVE: *Xylella fastidiosa*, transmissão, mudas, sementes, *Coffea arabica*.

ABSTRACT: The occurrence of *Xylella fastidiosa* in coffee plants (*Coffea arabica*) has been reported in several instances. The objective of this study was to determine the presence of *X. fastidiosa* in seeds and seedlings of coffee, as well as to explore the possibility of seed transmission of the bacterium. Twelve seed lots of coffee (*C. arabica*) of the cultivars IAPAR 59, Catuaí Amarelo, Catuaí Vermelho, Mundo Novo, Acaiaí, Sarchimor Amarelo, Icatu Precoce, Apoatã and IAPAR 75 163-21 were included in this study. The seed lot 102/C/98 of the cultivar IAPAR 59, was used in the seed transmission test. In the seed transmission test, seedlings at different stages of development, such as “palito-de-fósforo”, “orelha-de-onça”, and nursery trees at the stages of 2, 4, 5 and 6 pair of leaves, were examined for the presence of *X. fastidiosa*. Seedlings from nurseries were also examined for the presence of *X. fastidiosa*. The DAS-ELISA serological test was used to detect the presence of *X. fastidiosa* in coffee seeds and seedlings. *X. fastidiosa* was detected in eighth seed lots of the cultivars IAPAR 59, Catuaí Vermelho, Mundo Novo, Acaiaí and Sarchimor Amarelo. *X. fastidiosa* was not detected in seedlings obtained from contaminated seed lots. For the samples from the nurseries, the bacterium was detected in seedlings on the stages of 3, 4 and 6 pair of leaves. The results obtained in this study indicated that the coffee trees can be infected by *X. fastidiosa* in the early stages of development, when they are still in the nurseries.

INTRODUÇÃO

Xylella fastidiosa (Wells *et al.*, 1987) foi relatada causando depauperamento em cafeeiro (*Coffea arabica* L.) no Estado de São Paulo em 1995 (Paradela *et al.*, 1995). Atualmente, a associação de *X. fastidiosa* com cafeeiro já foi constatada nos Estados de São Paulo, Minas Gerais, Goiás, Paraná e Bahia (Paradela *et al.*, 1995; Lima *et al.*, 1996; Ueno & Leite, 1996). 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). Sintomas de queima de bordas de folhas também tem sido associados com a infecção de cafeeiro (*C. arabica*) por *X. fastidiosa* (Lima *et al.*, 1996). A bactéria *X. fastidiosa* é transmitida por insetos sugadores do xilema, em particular cigarrinhas da família Cicadellidae (Hopkins, 1989). Entretanto, a bactéria também pode ser transmitida através de material propagativo contaminado (Hopkins, 1989). O presente trabalho teve como objetivos examinar a ocorrência da bactéria *X. fastidiosa* em sementes de cafeeiro e verificar a possível transmissão da mesma para mudas produzidas a

partir de sementes naturalmente infectadas. Também foi objetivo do estudo examinar a presença da bactéria em mudas de cafeeiro em diferentes estádios de desenvolvimento.

MATERIAL E MÉTODOS

Para estudo da presença de *X. fastidiosa* em sementes de cafeeiro, amostras de 12 lotes de sementes compreendendo 9 cultivares de cafeeiro (*C. arabica*) foram obtidas junto à Unidade de Beneficiamento de Sementes do IAPAR, Londrina, PR. As amostras examinadas foram as seguintes: IAPAR 59 (lotes 101/C/98; 102/C/98; 123/C/98; 124/C/98), Catuaí Amarelo (118/C/98), Catuaí Vermelho (116/C/98), Mundo Novo (107/C/98), Acaiaí (114/C/98), Sarchimor Amarelo (Safrá 97/98), Icatu Precoce (103/C/98), Apoatã (122/C/98) e IAPAR 75 163-21 (120/C/98). Foram realizadas três repetições por lote de sementes, totalizando 36 amostras. Cada amostra foi composta de 1,5 g de sementes. A detecção de *X. fastidiosa* nas amostras foi realizada através do teste serológico de DAS-ELISA.

Sementes do lote 102/C/98 da cultivar IAPAR 59, o qual apresentou resultado positivo para presença de *X. fastidiosa*, foi utilizado no estudo de transmissão da bactéria por semente. Mudas foram produzidas a partir deste lote de sementes sob condições protegidas em casa de vegetação. As mudas foram mantidas sob condições protegidas e avaliadas para presença de *X. fastidiosa* periodicamente em diferentes estádios de desenvolvimento como: palito-de-fósforo, orelha-de-onça, e mudas com 3, 4, e 6 pares de folhas. As amostras para detecção de *X. fastidiosa* foram compostas de três plântulas, sendo processadas 1,5 g de tecido. A detecção de *X. fastidiosa* nas amostras foi realizada através do teste serológico de DAS-ELISA.

No estudo da ocorrência de *X. fastidiosa* em mudas de cafeeiro em viveiro, foi realizada amostragem de plântulas em diferentes estádios de desenvolvimento, como palito-de-fósforo, orelha de onça, e mudas com 3, 4 e 6 pares de folhas. As mudas foram amostradas de canteiros mantidas em telado e ao ar livre. As amostras para detecção de *X. fastidiosa* foram compostas de três plântulas, sendo processadas 1,5 g de tecido. A detecção de *X. fastidiosa* nas amostras foi realizada através do teste serológico de DAS-ELISA.

Para detecção de *X. fastidiosa* em sementes e mudas de cafeeiro foi utilizado o teste serológico de ELISA (“enzyme-linked immunosorbent assay”). O procedimento do teste de ELISA empregado foi o DAS-ELISA (“Double Antibody Sandwich”) (Clark *et al.*, 1986). Anticorpo policlonal utilizado no teste de DAS-ELISA foi preparado através de injeções intramusculares de suspensão de células totais de *X. fastidiosa* isolada de ameixeira (isolado IAPAR 9746) em coelho da raça Nova Zelândia (Leite *et al.*, 1997). O teste de DAS-ELISA foi realizado basicamente conforme descrito anteriormente (Leite *et al.*, 1997). As amostras foram consideradas positivas ou suspeitas para presença de *X. fastidiosa* quando a média dos valores de absorbância a 410 nm foi pelo menos três vezes maior do que os valores médios obtidos para o controle tampão de extração (Clark & Adams, 1977).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

No teste realizado para detecção de *X. fastidiosa* em sementes de cafeeiro, a presença da bactéria foi constatada em sementes dos lotes 101/C/98, 102/C/98, 123/C/98 e 124/C/98 da cultivar IAPAR 59, 116/C/98 de Catuaí Vermelho, 107/C/98 de Mundo Novo, 114/C/98 de Acaiaí e safra 97/98 de Sarchimor Amarelo (Tabela 1). Sementes dos lotes 102/C/98 de IAPAR 59 e 114/C/98 de Acaiaí apresentaram resultados positivos em todas as três amostras examinadas (Tabela 1).

Os estudos realizados para examinar a presença de *X. fastidiosa* em mudas de cafeeiro produzidas a partir de sementes infectadas foi realizado com o lote de sementes 102/C/98 da cultivar IAPAR 59. Nos estudos realizados não foi detectado a presença da bactéria em plântulas em todos os estádios de desenvolvimento. Estes resultados sugerem que embora a bactéria *X. fastidiosa* possa estar presente em sementes de cafeeiro, não ocorre transmissão da bactéria via semente para plantas produzidas a partir de sementes naturalmente infectadas.

A presença de *X. fastidiosa* em mudas de cafeeiro provenientes de viveiros foi examinada em mudas mantidas em telado e em mudas mantidas ao ar livre. Os resultados obtidos evidenciaram maior consistência na ocorrência de *X. fastidiosa* em mudas a partir do estádio de 4 pares de folhas para mudas mantidas ao ar livre (Tabela 2). Para mudas de café mantidas em telado, a presença da bactéria foi detectada eventualmente em plântulas nos estádios de 3 e 4 pares de folhas. Esses resultados indicam que plantas de café estão sujeitos à infecção por *X. fastidiosa* desde os primeiros estádios de desenvolvimento das plantas, quando ainda estão no viveiro.

CONCLUSÕES

Xylella fastidiosa está presente em sementes de café. Entretanto, não ocorre a transmissão da bactéria para mudas produzidas a partir de sementes naturalmente infectadas.

Mudas de viveiro mantidas em telado e ao ar livre apresentam resultados positivos para presença da bactéria *X. fastidiosa* indicando ocorrer infecção das mudas já nos primeiros estádios de desenvolvimento das plantas de café.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CLARK, M.F. & ADAMS, A.N. Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *J. Gen. Virol.* 34:475-483. 1977.
- CLARK, M.F.; LISTER, R.M.; BAR-JOSEPH, M. ELISA techniques. *Methods in Enzymology.* 118:742-766. 1986.
- HOPKINS, D.L. *Xylella fastidiosa*: Xylem-limited bacterial pathogen of plants. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 27, p. 2711-290. 1989
- LEITE JR., R. P.; CARVALHO, G. S. 1998. Detecção de *Xylella fastidiosa* e *Meloidogyne* sp. associados a cafeeiros no Planalto de Vitória da Conquista, BA. **24º Congresso Brasileiro de Pesquisas Cafeeiras**, Poços de Caldas.
- LEITE, R.M.V.B.C.; LEITE, Jr., R.P. & CEREZINE, P.C. Flutuação populacional de *Xylella fastidiosa* em ameixeiras suscetíveis e resistentes à escaldadura da folha. *Fitopatologia Brasileira.*22:58-63. 1997.
- LIMA, J.E.O. de; MIRANDA, V.S.; COUTINHO, A.; ROBERTO, S.R.; CARLOS, E.F. Distribuição de *Xylella fastidiosa* no cafeeiro nas regiões cafeeiras, e seu isolamento in vitro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.21, p. 392-393. 1996.
- PARADELA FILHO, O.; SUGIMORI, M.H.; RIBEIRO, I.J.A.; MACHADO, M.A.; LARANJEIRA, F.F.; GARCIA JR., A. & BERETA, M.J.G. 1995. Primeira constatação em cafeeiro no Brasil da *Xylella fastidiosa* causadora da clorose variegada dos citros. **Laranja**, Cordeirópolis, v.16, p. 135-136.
- UENO, B. & LEITE, JR., R.P. Estudo da variabilidade de isolados de *Xylella fastidiosa* obtidos de cafeeiro e citros através da análise de proteínas totais. *Fitopatol. bras.* 21:341. 1996.
- WELLS, J.M.; RAJU, B.C.; HUNG, H.Y.; WEISBURG, W.G.; MANDELCO-PAUL, L. & BRENNER, D.J. *Xylella fastidiosa* gen. nov. sp. nov.: Gram-negative, xylem-limited fastidious plant bacteria related to *Xanthomonas* spp. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 37:136-143. 1987.

Cultivar de cafeeiro	Lote	Reação ao teste de DAS-ELISA				Média
		Repetição				
		1	2	3		
IAPAR 59	101/C/98	0,031 (-) ^a	0,046 (+)	0,026 (-)	0,034 ± 0,010 (-)	
IAPAR 59	102/C/98	0,044 (+)	0,073 (+)	0,056 (+)	0,058 ± 0,015 (+)	
IAPAR 59	123/C/98	0,013 (-)	0,012 (-)	0,081 (+)	0,035 ± 0,039 (-)	
IAPAR 59	124/C/98	0,056 (+)	0,036 (-)	0,065 (+)	0,052 ± 0,015 (+)	
Catuaí Amarelo	118/C/98	0,027 (-)	0,023 (-)	0,021 (-)	0,024 ± 0,003 (-)	
Catuaí Vermelho	116/C/98	0,034 (-)	0,036 (-)	0,059 (+)	0,043 ± 0,014 (+)	
Mundo Novo	107/C/98	0,048 (+)	0,031 (-)	0,037 (-)	0,039 ± 0,009 (+)	
Acaiaí	114/C/98	0,101 (+)	0,102 (+)	0,076 (+)	0,093 ± 0,015 (+)	
Sarchimor Amarelo	Safra 97/98	0,024 (-)	0,149 (+)	0,044 (+)	0,072 ± 0,067 (+)	
Icatu Precoce	103/C/98	0,022 (-)	0,017 (-)	0,006 (-)	0,017 ± 0,010 (-)	
Apoatã	122/C/98	0,034 (-)	0,010 (-)	0,020 (-)	0,021 ± 0,012 (-)	
IAPAR 75 163-21	120/C/98	0,014 (-)	0,019 (-)	0,014 (-)	0,016 ± 0,003 (-)	
Controle						
Isolado de <i>X. fastidiosa</i> 10 ⁶ ufc / ml					0,207 ± 0,018	
Isolado de <i>X. fastidiosa</i> 10 ⁵ ufc / ml					0,057 ± 0,021	
Tampão de extração					0,013 ± 0,013	

^a(+) = reação positiva ; (-) = reação negativa. As amostras foram consideradas positivas quando a média dos valores de absorbância a 410 nm obtidas em leitora de ELISA foi pelo menos 3 vezes maior que o valor médio do tampão de extração.

TABELA 1. Reação ao teste de DAS-ELISA para *X. fastidiosa* de sementes de cafeeiro obtidas na Unidade de Beneficiamento de Sementes da Estação Experimental do IAPAR, Londrina, PR.

Estádio de desenvolvimento	Local de coleta	Reação ao teste de DAS-ELISA				Média
		Repetição				
		I	II	III	IV	
Semente	-----	0,046 (-) ^a	0,055 (+)	0,034 (-)	0,044 (-)	0,045±0,009 (-)
Palito-de-fósforo	telado	0,039 (-)	0,025 (-)	0,037 (-)	0,050 (-)	0,038±0,010 (-)
Orelha-de-onça	telado	0,001 (-)	0,009 (-)	0,018 (-)	0,007 (-)	0,009±0,007 (-)
3 pares de folhas	telado	0,044 (-)	0,024 (-)	0,058 (+)	0,015 (-)	0,035±0,019 (-)
4 pares de folhas	telado	0,009 (-)	0,028 (-)	0,056 (+)	0,016 (-)	0,028±0,021 (-)
4 pares de folhas	ar livre	0,104 (+)	0,098 (+)	0,096 (+)	0,130 (+)	0,100±0,004 (+)
6 pares de folhas	ar livre	0,031 (-)	0,146 (+)	0,091 (+)	0,129 (+)	0,099±0,050 (+)
Controle						
Isolado de <i>X. fastidiosa</i> 10 ⁶ ufc / ml					0,298±0,015	
Isolado de <i>X. fastidiosa</i> 10 ⁵ ufc / ml					0,018±0,013	
Tampão de Extração					0,017±0,013	

^a(+) = reação positiva; (-) = reação negativa. As amostras foram consideradas positivas quando a média dos valores de absorbância a 410 nm obtidos em leitora de ELISA foi pelo menos 3 vezes maior que o valor médio do tampão de extração.

TABELA 2. Reação ao teste de DAS-ELISA para *X. fastidiosa* de sementes e mudas de cafeeiro cultivar IAPAR 59 coletadas em viveiro na Estação Experimental do IAPAR, Londrina, PR.

AVISO

ESTA PUBLICAÇÃO PODE SER ADQUIRIDA NOS
SEGUINTE ENDEREÇOS:

FUNDAÇÃO ARTHUR BERNARDES

Edifício Sede, s/nº. - Campus Universitário da UFV
Viçosa - MG
Cep: 36571-000
Tels: (31) 3891-3204 / 3899-2485
Fax : (31) 3891-3911

EMBRAPA CAFÉ

Parque Estação Biológica - PqEB - Av. W3 Norte (Final)
Edifício Sede da Embrapa - sala 321
Brasília - DF
Cep: 70770-901
Tel: (61) 448-4378
Fax: (61) 448-4425