

LEVANTAMENTO DA DISTRIBUIÇÃO DE *Xylella fastidiosa* ASSOCIADA A *Coffea* SPP. EM REGIÕES CAFEEIRAS DO PARANÁ¹

Flávia Maria de Souza CARVALHO, IAPAR, Londrina, PR: flaviaregis@bol.com.br;
Luciana MENEGUIM, IAPAR, Londrina, PR; Rui Pereira LEITE JR., IAPAR,
Londrina, PR: e-mail: ruileite@pr.gov.br

RESUMO: *Xylella fastidiosa* causa doenças de importância econômica em diversas plantas cultivadas. No Brasil, doenças causadas por *X. fastidiosa* têm se constituído em fator limitante para exploração de culturas como ameixeira e citros. Em cafeeiro (*Coffea arabica*), a bactéria foi constatada pela primeira vez em 1995 no Estado de São Paulo. No presente estudo, foram examinadas 394 amostras de cafeeiro coletadas em 133 propriedades produtoras de café das regiões Norte, Norte Pioneiro, Noroeste e Oeste do Estado do Paraná. A presença da bactéria em cafeeiro foi examinada através do teste de DAS-ELISA, utilizando anticorpo policlonal específico para *X. fastidiosa*, e pela técnica de PCR. No teste de DAS-ELISA 48,8 % das amostras examinadas das quatro regiões cafeeiras do Paraná apresentaram resultados positivos para presença de *X. fastidiosa*. Com base na reação de PCR utilizando os “primers” RST 31 e RST 33, 74,9 % das amostras de cafeeiro das regiões Norte e Norte Pioneiro apresentaram resultado positivo para presença da bactéria. Os resultados obtidos mostraram que a reação de PCR foi mais sensível para detecção da bactéria do que o teste de DAS-ELISA. Isolamentos de *X. fastidiosa* em meio BCYE foram estabelecidos das amostras de cafeeiro coletados nas regiões Norte, Norte Pioneiro e Noroeste do Paraná.

PALAVRA-CHAVE: *Xylella fastidiosa*, café, *Coffea arabica*, levantamento.

ABSTRACT: *Xylella fastidiosa* causes diseases of economic importance in several cultivated plants. In Brazil, diseases caused by *X. fastidiosa* have been a limiting factor for crops such as citrus and japanese plum. In coffee (*Coffea arabica*), the bacterium was reported for the first time in the State of São Paulo in 1995. In this study, we examined 394 samples of coffee trees collected in 133 coffee plantations in the North, Northeast, Northwest e West regions of the State of Parana, Brazil. The presence of the bacterium was examined by the DAS-ELISA test, using polyclonal antibody specific for *X. fastidiosa*, and the PCR technique. In the DAS-ELISA test, 48,8 % of the samples of the four coffee growing regions were positive for the presence of *X. fastidiosa*. Based on the PCR reaction using the primers RST 31 e RST 33, 74,9 % of the samples from the North and Northeast regions showed positive results for the presence of the bacterium. The PCR reaction was more sensitive than the DAS-ELISA test for the detection of *X. fastidiosa* in the coffee samples. *X. fastidiosa* was isolated in the BCYE medium from coffee samples collected in the North, Northeast and Northwest regions of Parana State, Brazil.

INTRODUÇÃO

X. fastidiosa (Wells *et al.*, 1987) causa doenças de importância econômica em diversas plantas cultivadas (Hopkins, 1989). No Brasil, doenças causadas por *X. fastidiosa* têm se constituído em fatores limitantes para exploração de culturas como ameixeira e citros. Em cafeeiro (*Coffea arabica* L.), a bactéria foi constatada pela primeira vez em 1995 no Estado de São Paulo (Paradela *et al.*, 1995). Cafeeiros infectados pela bactéria apresentavam ramos com internódios curtos, folhas pequenas, deformadas e cloróticas, e sintomas de depauperamento generalizado (Paradela *et al.*, 1995). Estudos recentes tem mostrado a presença da bactéria associada a cafeeiros em várias regiões produtoras dos Estados de São Paulo, Minas Gerais, Paraná e Bahia (Paradela *et al.*, 1995; Lima *et al.*, 1996; Ueno & Leite, 1996). Entretanto, faltam informações para determinar com maior precisão a extensão do problema nas diversas regiões cafeeiras do Brasil. O presente estudo objetivou realizar um levantamento da ocorrência de *X. fastidiosa* em cafeeiros nas diferentes regiões produtoras do Estado do Paraná.

MATERIAL E MÉTODOS

O levantamento da ocorrência de *X. fastidiosa* foi realizado nas regiões Norte, Norte Pioneiro, Noroeste e Oeste do Paraná. Foram coletadas três amostras de cafeeiro em cada lavoura escolhida ao acaso em cada

região produtora. Cada amostra foi devidamente acondicionada e encaminhada ao Laboratório de Bacteriologia e Virologia do IAPAR, Londrina, PR, para exame da presença de *X. fastidiosa*. O levantamento foi realizado nos meses de Setembro a Outubro de 1999 e de Fevereiro a Março de 2000.

O teste serológico de ELISA (“enzyme-linked immunosorbent assay”) empregado para detecção da bactéria nas amostras de cafeeiro foi o DAS-ELISA (“Double Antibody Sandwich”) (Clark *et al.*, 1986). Anticorpo policlonal utilizado no teste de 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 o procedimento descrito anteriormente (Leite *et al.*, 1997). As amostras foram consideradas positivas ou suspeitas para a presença de *X. fastidiosa* quando a média dos valores de absorvância a 410 nm foi pelo menos três vezes maior do que os valores médios obtidos para o controle tampão de extração (Clark & Adams, 1977).

Na detecção de *X. fastidiosa* através da técnica de PCR, folhas de plantas de cafeeiro foram pesadas (1,5 g) e processadas conforme descrito anteriormente (Minsavage *et al.*, 1994; Pinto & Leite, 1999). A partir do extrato diluído, o DNA total da bactéria foi extraído e purificado de acordo com o método de Ausubel *et al.* (1987). Sequências de DNA genômico foram amplificadas de *X. fastidiosa* utilizando os “primers” RST 31 (GCGTTAATTTTCGAAGTCATTCGATTGC) e RST 33 (CACCATTCGTATCCCGGTG) (Minsavage *et al.*, 1994) e o produto de PCR foi analisado através de eletroforese em gel de agarose 0,7%. Após coloração com brometo de etídio (1 µg/ml), o gel foi fotografado com Filme Polaroid 667 preto e branco (Polaroid, Cambridge, MA, EUA).

O isolamento da bactéria foi realizado para todas as amostras de cafeeiro. Seções de aproximadamente 3 cm de ramos de cada amostra foram desinfestadas superficialmente através da imersão em álcool, seguida de flambagem. As seções foram cortadas assepticamente e espremidas com auxílio de alicate. A seiva foi depositada sobre o meio de cultura BCYE (“buffered cyteine-yeast extract”) (Hopkins, 1988), através do toque da superfície do meio com a extremidade da seção. As placas foram incubadas a 28°C no escuro e observadas periodicamente, com auxílio de lupa em aumento de vinte e cinco vezes, por até 30 dias, para verificação da presença de colônias de *X. fastidiosa* (Uchibaba *et al.*, 1992).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

No levantamento realizado para determinar a ocorrência de *X. fastidiosa* foram amostradas lavouras com idades variando entre 1 e 45 anos. As cultivares amostradas no levantamento foram: IAPAR 59, Catuaí Vermelho, Catuaí Amarelo, Mundo Novo, Sumatra, Icatu, Icatu Precoce, Icatu Vermelho, Caturra, Sarchimor Obata, Sarchimor 21, Bourbon Vermelho, Tupy, Catimor, Acaiá, IAC 1669-33, e Pindorama. A presença de *X. fastidiosa* foi examinada em 133 propriedades das regiões Norte, Norte Pioneiro, Noroeste e Oeste do Paraná, tendo sido coletadas 394 amostras (Tabela 1).

No teste serológico de DAS-ELISA, a presença da bactéria *X. fastidiosa* foi detectada em todas as regiões produtoras, com percentual de amostras positivas variando de 28,6 % a 63,7 % (Tabela 1). A região Norte Pioneiro foi a que apresentou maior incidência de *X. fastidiosa*, com 63,7 % das amostras positivas no teste DAS-ELISA para presença da bactéria (Tabela 1).

Na reação de PCR, fragmento de aproximadamente 733 pb foi amplificado com sucesso de amostras de plantas de cafeeiro (Figura 1). Entre um total de 153 amostras coletadas na região Norte do Paraná, 122 amostras apresentaram resultados positivos para presença de *X. fastidiosa* pelo teste de PCR, representando 79,7% das amostras examinadas (Tabela 1). Esse foi o maior percentual de amostras positivas para presença de *X. fastidiosa* (Tabela 1). Com base nos resultados obtidos, a reação de PCR foi mais sensível para detecção de *X. fastidiosa* do que o teste serológico de DAS-ELISA. Esta maior sensibilidade do teste PCR já era esperado visto que este método tem o potencial de detecção de *X. fastidiosa* em torno de 10 a 100 UFC/ml contra uma sensibilidade superior a 10³ UFC/ml para o teste de ELISA (Minsavage *et al.*, 1994; Pinto & Leite, 1999).

Tentativas de estabelecimento de culturas puras da bactéria *X. fastidiosa* a partir de plantas de cafeeiro pelo isolamento em meio BCYE foram bem sucedidas. Foram obtidos 17 isolados de *X. fastidiosa* das 51 propriedades da região Norte do Paraná, 4 isolados das 28 propriedades da região Norte Pioneiro e 1 isolado das 40 propriedades da região Noroeste, representando eficiência no isolamento de 2,5 a 33,0 % (Tabela 1). Nas amostras das 14 propriedades da região Oeste do Paraná não foi obtido nenhum isolado bacteriano.

Região cafeeira	Nº propriedades amostradas	Total de amostras examinadas	% de amostras positivas		
			ELISA	PCR	Isolamento
Norte	51	153	52,9	79,7	33,0
Norte Pioneiro	28	80	63,7	70,0	14,0
Noroeste	40	119	28,6	nd ^a	2,5
Oeste	14	42	50,0	nd	0,0

^and, não determinado.

Tabela 1. Resultado da reação de DAS-ELISA, PCR e isolamento da bactéria *X. fastidiosa* em cafeeiros.

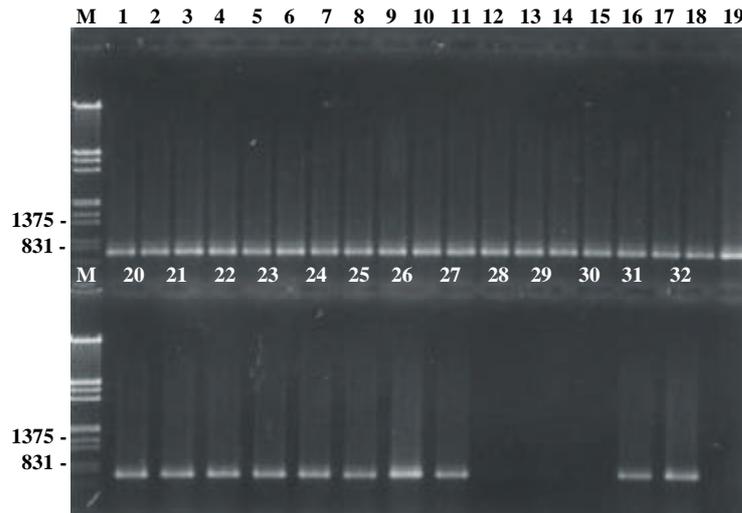


Figura 1. Amplificação de fragmento de aproximadamente 733 pb do DNA genômico de *Xylella fastidiosa* utilizando os "primers" RST 31 e RST 33. Linhas 1 a 27 e 31 correspondem ao fragmento amplificado de amostras de café da Região Norte do Paraná. Linhas 19 e 32 correspondem ao controle positivo (DNA extraído da cultura 11752 de *X. fastidiosa* isolada de café). M corresponde ao marcador λ digerido com *EcoRI* e *HindIII*.

CONCLUSÕES

Embora o teste de PCR seja mais sensível que o teste de DAS - ELISA, chegando a detectar entre 10 a 100 células de *X. fastidiosa*, no presente estudo os dois teste apresentam resultados semelhantes para detecção de *X. fastidiosa*. Este resultado pode estar relacionado à possível presença de grande número de células bacterianas nas plantas infectadas de cafeeiro das regiões Norte e Norte Pioneiro do Paraná.

Este trabalho mostra que a bactéria *X. fastidiosa* está distribuída amplamente em todas as principais regiões cafeeiras do Estado do Paraná.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AUSUBEL, F.M., BRENT, R., KINGSTON, R.E., MOORE, D.D. SEIDMAN, J.G., SMITH, J.A., & STRUHL, K. Current Protocols in Molecular Biology. J. Wiley & Sons, New York. 1987.
- 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* and other fastidious bacteria of uncertain affiliation. In: Schaad, N.M. ed. Laboratory guide for the identification of plant pathogenic bacteria, 2nd ed. Saint Paul, American Phytopathological Society. 1988. P 95-113.
- HOPKINS, D.L. *Xylella fastidiosa*; xylem-limited bacterial pathogen of plants. Annu. Ver. Phytopathol. 27:271-290. 1989.
- 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 bras. 22:58-63. 1997.
- LIMA, J.E.O.; 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*. Fitopatol. bras. 21:392-393. 1996.

- MINSAVAGE, G.V., THOMPSON, C.M., HOPKINS, D.L., LEITE, R.M.V.B. & STALL, R.E. Development of a polymerase chain reaction protocol for detection of *Xylella fastidiosa* in plant tissue. *Phytopathology*. 84:456-461. 1994.
- PARADELA 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. 1:135-136. 1995.
- PINTO, F.G.S. & LEITE JR., R.P. Detecção de *Xylella fastidiosa* em *Coffea* spp. através da técnica de PCR. *Fitopatol. bras.*, Suplemento, 24:254. 1999.
- UCHIBABA, E.Y.; LEITE JR., R.P. & LEITE, R.M.V.B.C. Avaliação de meios de cultura gerais e específicos par cultivo de *Xylella fastidiosa* isolada de ameixeira com escaldadura da folha. *Fitopatol. bras.* 17:252-257. 1992.
- 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.

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