

Detecção de *Xylella fastidiosa* em Germoplasma de Cafeeiro

Marcos A. Yorinori^{1*}, Alessandra F. Ribas², Bernardo Ueno³, Nelson S. Massola Júnior¹
& Rui P. Leite Júnior^{2**}

¹Universidade Estadual de Londrina, CEP 86051-990, Londrina, PR, (43) 3328-4440, e-mail: yorinori@sercomtel.com.br;

²Instituto Agronômico do Paraná, Cx. Postal 481, CEP 86047-902, Londrina, PR, (43) 3376-2289, e-mail: ruileite@pr.gov.br;

³Departamento de Fitopatologia, Universidade de Brasília, CEP 70910-900, Brasília, DF

(Aceito para publicação em 31/03/2003)

Autor para correspondência: Rui Pereira Leite Jr.

YORINORI, M.A., RIBAS, A.F., UENO, B., MASSOLA JÚNIOR, N.S. & LEITE JÚNIOR, R.P. Detecção de *Xylella fastidiosa* em germoplasma de cafeeiro. Fitopatologia Brasileira 28:427-430. 2003.

RESUMO

A bactéria *Xylella fastidiosa* possui uma ampla gama de plantas hospedeiras que inclui espécies de pelo menos 28 famílias de mono e dicotiledôneas. Em cafeeiro (*Coffea* spp.), a ocorrência dessa bactéria foi relatada previamente em cultivares da espécie *Coffea arabica*. Estudos foram realizados para determinar a presença de *X. fastidiosa* em diferentes espécies e híbridos interespecíficos de cafeeiro. As amostragens foram realizadas em dois anos consecutivos. As espécies de cafeeiro examinadas foram: *C. kapakata*, *C. canephora*, *C. racemosa*, *C. arabica*, *C. dewevrei*, *C. stenophylla* e *C. eugenioides*. Também foram incluídos neste estudo híbridos interespecíficos de *C. arabica*: *C. arabica* x *C. dewevrei*, *C. arabica* x *C. eugenioides*, *C. arabica* x *C. racemosa* e *C. arabica* x *C. robusta*. Foram coletadas amostras de ramos plagiotrópicos de diferentes plantas para cada

espécie e híbrido. A detecção de *X. fastidiosa* nas amostras foi realizada utilizando os testes serológicos de DAS-ELISA e imunofluorescência indireta. A bactéria foi detectada nas sete espécies e nos quatro híbridos de cafeeiro examinados. Entretanto, as plantas aparentemente não apresentavam sintomas de infecção por *X. fastidiosa*. A espécie *C. arabica* apresentou a maior proporção de amostras positivas e maiores valores de absorvância no teste de DAS-ELISA. Em contraste, as espécies *C. racemosa* e *C. dewevrei* foram as que apresentaram menores proporções de amostras positivas para presença de *X. fastidiosa*, como também menores valores de absorvância no teste de DAS-ELISA.

Palavras-chave adicionais: café, DAS-ELISA, imunofluorescência indireta, hospedeiro.

ABSTRACT

Detection of *Xylella fastidiosa* in coffee germplasm

The bacterium *Xylella fastidiosa* has a large host range, including species of 28 different mono and dicotyledonous plant families. On coffee (*Coffea* spp.), *X. fastidiosa* was previously reported only on the species *Coffea arabica*. Studies were carried out to determine the presence of *X. fastidiosa* in different species and interspecific hybrids of coffee. The species of coffee included in this study were the following: *C. kapakata*, *C. canephora*, *C. racemosa*, *C. arabica*, *C. dewevrei*, *C. stenophylla* and *C. eugenioides*. The interspecific hybrids of *C. arabica* examined were the following: *C. arabica* x *C. dewevrei*, *C. arabica* x *C. eugenioides*, *C. arabica* x *C. racemosa* and *C. arabica* x *C. robusta*. Samples were collected from plagiotropic

branches of different plants for each species or hybrid. Four replicates were examined for each coffee accession examined. Detection of *X. fastidiosa* in the samples was determined by DAS-ELISA and indirect immunofluorescence. The bacterium was detected in all seven species and four hybrids of coffee studied. However, the plants did not show any symptom of infection by *X. fastidiosa*. The species *C. arabica* showed the highest proportion of positive samples and the largest absorbance values in the DAS-ELISA test. In contrast, the species *C. racemosa* and *C. dewevrei* showed the lowest proportion of positive samples for the presence of *X. fastidiosa*, as well as, the lowest absorbance values in the DAS-ELISA test.

A bactéria *Xylella fastidiosa* Wells *et al.* (Wells *et al.*, 1987) possui ampla gama de hospedeiros que inclui espécies de pelo menos 28 famílias de plantas mono e dicotiledôneas (Hopkins, 1989; Purcell & Hopkins, 1996). Apesar de muitas plantas hospedeiras não apresentarem sintomas quando infetadas por *X. fastidiosa*, elas podem servir como hospedeiros alternativos para a bactéria, constituindo em fontes de inóculo para a ocorrência de doenças em plantas cultivadas (Hopkins, 1989; Leite *et al.*, 1997). Além disso, esta bactéria causa doenças

de importância econômica em diversas plantas cultivadas como alfafa (*Medicago sativa* L.), ameixeira (*Prunus salicina* Lindl), citros (*Citrus* spp.), pessegueiro [*Prunus persicae* (L.) Batsch] e videira (*Vitis vinifera* L.) (Hopkins, 1989; Purcell & Hopkins, 1996). A ocorrência de doenças causadas por *X. fastidiosa* já foi reportada nas Américas do Norte, Central e do Sul (Hopkins, 1989; Leite, 2002). Na América do Sul, *X. fastidiosa* tem sido relatada causando a escaldadura da folha em ameixeira e a clorose variegada em citros na Argentina, Brasil e Paraguai (Leite, 2002). A bactéria também foi constatada causando doença em *Catharanthus roseus* L. no Estado do Paraná (Ueno *et al.*, 1998).

*Bolsista da CAPES

**Bolsista do CNPq

O mecanismo de patogenicidade da bactéria sugere que os sintomas produzidos por estresse hídrico sejam causados devido à oclusão de vasos do xilema por agregados da bactéria, gomas e tiloses, podendo também estar associada à presença de fitotoxinas e desbalanço hormonal (Hopkins, 1989; Purcell & Hopkins, 1996). Além da presença de goma no xilema, também têm sido observadas divisões celulares anormais no xilema, floema e córtex do caule, bem como no mesófilo e no córtex da região da nervura foliar (Queiroz-Voltan *et al.*, 1998).

Xylella fastidiosa é transmitida por material propagativo e por insetos vetores, particularmente cigarrinhas da família Cicadellidae (Hopkins, 1989; Purcell & Hopkins, 1996). Cigarrinhas presentes na cultura do cafeeiro (*Coffea* spp.) normalmente pertencem às famílias Cicadidae, Aethalionidae e Cicadellidae (Gallo *et al.*, 1988). Além disso, levantamentos realizados no Estado do Paraná revelaram a presença de mais de 100 diferentes espécies de cigarrinhas em cafeeiros, sendo que pelo menos 80% dessas espécies pertencem à família Cicadellidae (Lovato *et al.*, 2001).

Xylella fastidiosa foi relatada pela primeira vez ocorrendo em cafeeiro (*Coffea arabica* L.) da cultivar Mundo Novo no Estado de São Paulo em 1995 (Paradela *et al.*, 1995). Cafeeiros infetados pela bactéria apresentavam ramos com internódios curtos, folhas cloróticas, pequenas e deformadas, abscisão foliar e seca de ramos (Paradela *et al.*, 1995). Sintomas de queima de bordas de folhas também têm sido associados com a infecção de cafeeiro por *X. fastidiosa* (Lima *et al.*, 1996).

A presença da bactéria associada ao cafeeiro tem sido relatada nas diferentes regiões produtoras de café, dos principais Estados produtores, como São Paulo, Minas Gerais, Paraná, Espírito Santo e Bahia (Paradela *et al.*, 1995; Lima *et al.*, 1996; Ueno & Leite, 1996). Entretanto, esses relatos têm se restringido às cultivares da espécie *C. arabica*. O presente estudo teve por objetivo investigar a presença de *X. fastidiosa* em diferentes espécies e híbridos interespecíficos de *Coffea* e determinar a susceptibilidade desse germoplasma à infecção pela bactéria.

Neste estudo foram examinadas plantas de espécies de cafeeiro e híbridos interespecíficos de *C. arabica* com aproximadamente 20 a 23 anos e 13 anos de idade, respectivamente, pertencentes à Coleção de Germoplasma de Cafeeiro do Instituto Agrônomo do Paraná - IAPAR. A Coleção está estabelecida em solo do tipo latossolo roxo na Estação Experimental do IAPAR, Londrina, PR, situada na latitude de 23° 30'S, longitude de 51° 32'W e altitude de 746 m m.s.l., com as seguintes médias climáticas anuais: temperatura 20,3 °C, umidade relativa 69% e precipitação 1.727,5 mm. Foram examinadas sete espécies de cafeeiro: *C. arabica*, *C. canephora* Pierre, *C. dewevrei* de Wild y Durand, *C. eugenioides* Moore, *C. kapakata* (A. Chev.) Bridson, *C. racemosa* Lour. e *C. stenophylla* G. Don e quatro híbridos, *C. arabica* x *C. dewevrei*, *C. arabica* x *C. eugenioides*, *C. arabica* x *C. racemosa* e *C. arabica* x *C. robusta*. As avaliações foram realizadas em dois anos consecutivos. Foram coletadas quatro amostras de ramos plagiotrópicos com aproximadamente 0,4 a 0,6 cm de diâmetro de plantas diferentes para cada espécie e híbrido, com quatro

repetições, sendo que cada repetição foi constituída de uma planta diferente.

Para detecção de *X. fastidiosa* nas diferentes espécies e híbridos interespecíficos de cafeeiro foram utilizados os testes serológicos de ELISA (“enzyme-linked immunosorbent assay”) e imunofluorescência indireta. O procedimento do teste de ELISA empregado foi o DAS-ELISA (“Double Antibody Sandwich”) (Clark *et al.*, 1986). O teste de DAS-ELISA foi realizado basicamente conforme descrito por 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).

Para o teste de imunofluorescência indireta foi utilizado o protocolo descrito por De Boer (1990) com algumas modificações. Foram adicionados 30 µl de água destilada em cada vaso das lâminas de imunofluorescência e a seguir os ramos foram cortados em segmentos pequenos e espremidos com alicate sobre a gota de água no vaso. A seiva do ramo foi misturada de forma que a amostra ficasse homogênea. As amostras foram fixadas nas lâminas por secagem, utilizando secador de cabelos. A seguir, as amostras foram tratadas com etanol 96% por 10 min. O anticorpo específico para *X. fastidiosa* (Leite *et al.*, 1997) foi diluído a 1:500 em PBS + 0,2% de leite desnatado (agente bloqueador). Foram adicionados 20 µl do anticorpo primário diluído em cada vaso da lâmina e estas foram incubadas em câmara úmida a 37 °C por 30 min. As lâminas foram lavadas com água destilada por três vezes e deixadas em PBS por 30 min para retirar o excesso de anticorpo primário. As lâminas foram novamente secas com secador de cabelos. Em seguida, 20 µl do anticorpo secundário diluído (1:200 anticorpo específico para imunoglobulina de coelho conjugado com corante fluorescente TRITC; isotiocianato de tetrametilrodamina em PBS) + 0,2% de leite desnatado foi colocado em cada vaso da lâmina. As amostras foram então incubadas em condição de escuro em câmara úmida por 30 min. As lâminas foram lavadas com água destilada por três vezes e colocadas em PBS por 30 min para retirar o excesso de anticorpo secundário. As lâminas passaram novamente por processo de secagem e em seguida, foram montadas com uma gota de solução 90% de glicerol + 10% PBS sobre cada vaso da lâmina. As lâminas foram observadas em microscópio com lâmpada fluorescente em aumento de 400 vezes. As amostras foram consideradas positivas quando foi possível observar células bacterianas fluorescentes.

As avaliações para determinar a presença da bactéria *X. fastidiosa* em diferentes espécies e híbridos interespecíficos de cafeeiro foram realizadas em dois anos consecutivos, 1998 e 1999 (Tabela 1). No primeiro ano de avaliação, apenas as espécies *C. racemosa* e *C. dewevrei* não apresentaram resultados positivos para presença de *X. fastidiosa*, em nenhuma das duas técnicas utilizadas (Tabela 1). No segundo ano, todas as espécies e híbridos examinados apresentaram resultados positivos para presença da bactéria pelo teste de DAS-ELISA (Tabela 1). A espécie *C. arabica* foi a que

apresentou os valores mais elevados de absorvância no teste de DAS-ELISA entre as sete espécies de *Coffea* examinadas (Tabela 1). Além disso, todas as amostras de *C. arabica* examinadas apresentaram resultados positivos para presença de *X. fastidiosa* (Tabela 1). Em contraste, as demais espécies não apresentaram resultados positivos para todas as amostras (Tabela 1). As espécies *C. racemosa* e *C. dewevrei* foram as que apresentaram menores proporções de amostras positivas, como também menores valores de absorvância no teste de DAS-ELISA no ano de 1999, da mesma forma que *C. stenophylla* em 1998 (Tabela 1).

Entre os híbridos interespecíficos, os genótipos *C. arabica* x *C. eugenioides* e *C. arabica* x *C. robusta* apresentaram os valores mais elevados de absorvância no teste de DAS-ELISA para presença de *X. fastidiosa*, como também as maiores proporções de amostras positivas nos testes de DAS-ELISA e imunofluorescência para presença da bactéria (Tabela 1). Por outro lado, o híbrido interespecífico *C. arabica* x *C. dewevrei* apresentou os menores valores para incidência da bactéria e absorvância no teste de DAS-ELISA realizados em 1998 (Tabela 1).

As diferenças observadas entre as amostras de um mesmo genótipo nos testes serológicos de DAS-ELISA e imunofluorescência para presença de *X. fastidiosa* podem ser atribuídas a diversos fatores, como, por exemplo, à distribuição não uniforme da bactéria nos tecidos da planta (Hopkins, 1989; Purcell & Hopkins, 1996). A bactéria *X. fastidiosa* não apresenta colonização uniforme dos vasos do xilema da planta hospedeira, sendo encontrada normalmente na forma de agregados, que tendem a se acumular em partes específicas da planta (Purcell & Hopkins, 1996). Outro fator a ser considerado está relacionado à amostragem de tecido vegetal para o teste de

DAS-ELISA, no qual normalmente é utilizado somente 1,5 g de tecido, possibilitando desta forma a ocorrência de variações nos resultados de detecção da bactéria. Em último caso, pode-se considerar que as plantas poderiam realmente não estar infetadas pela bactéria *X. fastidiosa*.

Cabe ressaltar que o teste de imunofluorescência indireta revelou maior sensibilidade na detecção de *X. fastidiosa* do que o teste de DAS-ELISA. Isto pode ser exemplificado pelos resultados obtidos no primeiro ano de avaliação do germoplasma de cafeeiro, quando foram utilizadas as duas técnicas para detecção da bactéria. Nesta avaliação, a presença de *X. fastidiosa* não foi detectada somente nas espécies *C. dewevrei* e *C. racemosa* pelo teste de imunofluorescência, enquanto que pelo teste de DAS-ELISA, a bactéria não foi detectada em quatro acessos de cafeeiro (Tabela 1). Este resultado não é surpreendente visto que o teste de imunofluorescência está entre as técnicas mais sensíveis para detecção de bactérias, com nível de sensibilidade de até 1.000 vezes superior ao teste de DAS-ELISA (Saettler *et al.*, 1989).

De modo geral, os resultados obtidos indicam que as diferentes espécies e híbridos de *Coffea* são hospedeiros de *X. fastidiosa*. Estes resultados vêm ampliar a gama de plantas hospedeiras de *X. fastidiosa*, que já incluem centenas de espécies de plantas mono e dicotiledôneas distribuídas em pelo menos 28 famílias (Hopkins, 1989; Purcell & Hopkins, 1996). Entretanto, as plantas de espécies e híbridos de cafeeiro examinadas não apresentavam sintomas de alterações no desenvolvimento em função de infecção por *X. fastidiosa*. Os sintomas normalmente associados à infecção por *X. fastidiosa* variam com a planta hospedeira e são os mais diversos possíveis. Entre os sintomas mais comuns de doenças

TABELA 1 - Reação de espécies e híbridos interespecíficos de cafeeiro (*Coffea* spp.) aos testes de DAS-ELISA e imunofluorescência indireta para presença de *Xylella fastidiosa*

Germoplasma de Cafeeiro	Incidência			Valor Médio de Absorvância	
	DAS-ELISA ^a		Imuno ^b	DAS-ELISA ^c	
	1998	1999		1998	1999
Espécie					
<i>Coffea kapakata</i>	1/2	3/4	1/4	0,043 (+)	0,111 (+)
<i>C. canephora</i>	2/2	3/4	3/4	0,068 (+)	0,081 (+)
<i>C. racemosa</i>	0/2	2/4	0/2	0,023 (-)	0,078 (+)
<i>C. arabica</i>	2/2	4/4	2/2	0,050 (+)	0,209 (+)
<i>C. dewevrei</i>	0/2	3/4	0/2	0,011 (-)	0,055 (+)
<i>C. stenophylla</i>	0/2	2/4	2/2	0,021 (-)	0,136 (+)
<i>C. eugenioides</i>	2/2	3/4	2/4	0,040 (+)	0,158 (+)
Híbrido Interespecífico					
<i>C. arabica</i> x <i>C. dewevrei</i>	0/2	2/4	1/2	0,002 (-)	0,107 (+)
<i>C. arabica</i> x <i>C. eugenioides</i>	2/2	3/4	2/2	0,058 (+)	0,224 (+)
<i>C. arabica</i> x <i>C. racemosa</i>	1/2	3/4	1/2	0,040 (+)	0,040 (+)
<i>C. arabica</i> x <i>C. robusta</i>	1/2	2/4	2/2	0,050 (+)	0,307 (+)
Controle					
Isol. de <i>X. f.</i> 10 ⁶ ufc/ml ^d				0,307	0,212
Tampão de extração				0,013	0,009

^aReação ao teste de DAS-ELISA: número de amostras positivas/total de amostras examinadas.

^bReação ao teste de imunofluorescência indireta: número de amostras positivas/total de amostras examinadas.

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

^d Suspensão bacteriana de *X. fastidiosa* preparada em tampão de extração.

causadas por *X. fastidiosa* estão as queimas de bordos de folhas, secas de ramos, encurtamentos de internódios, reduções de crescimento e declínios generalizados (Hopkins, 1989; Purcell & Hopkins, 1996). A ocorrência de hospedeiros assintomáticos para *X. fastidiosa* tem sido relatada na literatura por vários autores (Hopkins, 1989; Purcell & Hopkins, 1996). Além disso, a manifestação de sintomas de doenças causadas por *X. fastidiosa* normalmente pode demorar meses ou até anos (Hopkins, 1989; Purcell & Hopkins, 1996). De qualquer forma, plantas infetadas por *X. fastidiosa*, mesmo sem apresentar qualquer sintoma, são fontes potenciais de inóculo da bactéria (Colleta Filho *et al.*, 1998). Os resultados obtidos no presente estudo ampliam a gama de plantas hospedeiras de *X. fastidiosa*, incluindo diferentes espécies de *Coffea* e híbridos interespecíficos de *C. arabica*.

AGRADECIMENTOS

Nossos agradecimentos ao CNPq e Consórcio Brasileiro de Pesquisas e Desenvolvimento do Café – CBPD/Café pelo apoio financeiro. Tumoro Sera, José Alves e Caio K. Funada deram suporte técnico para a realização dos trabalhos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CLARK, M.F. & ADAMS, A.N. Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *Journal of General Virology* 34:475-483. 1977.
- CLARK, M.F., LISTER, R.M. & BAR-JOSEPH, M. ELISA techniques. *Methods in Enzymology* 118:742-766. 1986.
- COLLETA FILHO, H.D., BORGES, K.M. & MACHADO, M.A. Detecção de *Xylella fastidiosa* em plantas matrizes de laranja doce assintomáticas para a CVC. *Fitopatologia Brasileira* 23:208. 1998 (Resumo).
- DE BOER, S.H. Immunofluorescence for bacteria. In: Hampton, R.O., Ball, E.M. & De Boer, S.H. (Eds.) *Serological Methods for Detection and Identification of Viral and Bacterial Plant Pathogens*. St. Paul, MN. APS Press. 1990. pp.295-298.
- GALLO, D., NAKANO, O., SILVEIRA NETO, S., CARVALHO, R.P.L., BATISTA, G.C., BERTI FILHO, E., PARRA, J.R.P., ZUCCHI, R.A., ALVES, S.B. & VENDRAMIM, J.D. *Manual de Entomologia Agrícola*. 2ª ed. São Paulo. Ceres. 1988.
- HOPKINS, D.L. *Xylella fastidiosa*: Xylem-limited bacterial pathogen of plants. *Annual Review of Phytopathology* 27:271-290. 1989.
- LEITE, JR., R.P. Ocorrência de *Xylella* em café no Brasil. Programa e Resumos XXV Congresso Paulista de Fitopatologia. Espírito Santo do Pinhal, SP. 2002. pp.32-34.
- 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* 21:392-393. 1996.
- LOVATO, L., SIMÕES, H.C., ZANDONÁ, C., MENEGUIM, A.M. & LEITE, JR., R.P. Ocorrência de cigarrinhas vetoras da bactéria *Xylella fastidiosa* em lavouras cafeeiras no estado do Paraná. Resumos Expandidos do II Simpósio de Pesquisas dos Cafés do Brasil, Vitória, ES, Brasil. 2001.
- PARADELA FILHO, O., SUGIMORI, M.H., RIBEIRO, I.J.A., MACHADO, M.A., LARANJEIRA, F.F., GARCIA JR., A. & BERETA, M.J.G. Primeira constatação em cafeeiro no Brasil da *Xylella fastidiosa* causadora da clorose variegada dos citros. *Laranja* 16:135-136. 1995.
- PURCELL, A. & HOPKINS, D.L. Fastidious xylem-limited bacterial plant pathogens. *Annual Review of Phytopathology* 34:131-151. 1996.
- QUEIROZ-VOLTAN, R.B., PARADELA FILHO, O., CARELLI, M.L.C. & FAHL, J.I. Aspectos estruturais de cafeeiro infectado com *Xylella fastidiosa*. *Bragantia* 57:23-33. 1998.
- SAETTLER, A.W., SCHAAD, N.W. & ROTH, D.A. *Detection of Bacteria in Seed and Other Planting Material*. St. Paul, MN. APS Press. 1989.
- 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. *Fitopatologia Brasileira* 21:341. 1996 (Resumo).
- UENO, B., FUNADA, C.K., YORINORI, M.A. & LEITE, JR., R.P. First report of *Xylella fastidiosa* on *Catharanthus roseus* in Brazil. *Plant Disease* 82:720-720. 1998.
- 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. *International Journal of Systematic Bacteriology* 37:136-143. 1987.