

ESTUDO DE HOSPEDEIROS ALTERNATIVOS DE *Xylella fastidiosa* ASSOCIADA A *Coffea* spp.

NUNES, D.H.¹; CARVALHO, F.M.S.¹; PAIÃO, F.G.¹; MENEGUIM, L.² e LEITE Jr., R.P.¹

¹ IAPAR, Londrina-PR, <daily-nunes@bol.com.br>; ² UNIFIL, Londrina-PR, <lmenegui@pr.gov.br>;

RESUMO: O café (*Coffea arabica*) é largamente cultivado no Brasil. A escaldadura da folha do café causada por *Xylella fastidiosa* tem sido associada a grandes prejuízos à cafeicultura. *X. fastidiosa* é uma bactéria Gram-negativa limitada ao xilema de plantas, transmitida por insetos vetores. Cafeeiros infectados podem apresentar sintomas como redução de porte e folhas de tamanho reduzido e cloróticas. O objetivo deste estudo foi identificar espécies de plantas invasoras de lavouras cafeeiras e plantas cultivadas que possam ser hospedeiras alternativas da bactéria. Foram semeadas e inoculadas 32 espécies diferentes em casa de vegetação, no IAPAR, Londrina-PR. Para inoculação, foram utilizadas suspensões dos isolados 12762, 12726, 12781, 12968 e 12373 de *X. fastidiosa*. As plantas foram inoculadas pelo método de perfuração com alfinete e enxertia e acompanhadas periodicamente, para verificar a manifestação de sintomas. Também foram coletadas plantas de *Arachis pintoii*, na Estação Experimental do IAPAR, Paranavaí-PR. As espécies inoculadas foram submetidas aos testes de PCR (“polymerase chain reaction”) e DAS-ELISA (“double antibody sandwich”-“enzyme-linked assay”), para detecção da bactéria. Na espécie *A. pintoii* foi realizado somente o teste de DAS-ELISA. Pelo teste de PCR não foi identificada nenhuma espécie de planta hospedeira da bactéria. Pelo teste de DAS-ELISA foram identificadas como potenciais hospedeiras alternativas de *X. fastidiosa* as espécies *A. pintoii*, *N. tabacum* - TNN, *N. clevelandii*, *N. turkishin*, *Brachiaria decumbens* e *Catharanthus roseus*. Nenhuma das espécies inoculadas apresentou sintomas característicos de infecção por *X. fastidiosa*.

Palavras-chave: *Xylella fastidiosa*, hospedeiro alternativo, PCR, DAS-ELISA.

STUDIES ON ALTERNATIVE HOST FOR *Xylella fastidiosa* ASSOCIATED WITH *Coffea* spp.

ABSTRACT: Coffee (*Coffea arabica*) is a major cash crop in Brazil. The coffee leaf scald caused by *Xylella fastidiosa* has been associated to large losses in coffee production. *X. fastidiosa* is a Gram-negative bacterium, xylem-limited and transmitted by xylem feeding insect vectors. Infected plants may show symptoms as reduced size of the tree and leaf chlorosis. The aim of this study was the identification of

alternative host for the bacterium among weed plants commonly present in coffee plantations and also among cultivated plants. Thirty-two different species were included in this study. The plants were inoculated with suspensions of the strains 12762, 12726, 12781, 12968 and 12373 of *X. fastidiosa*. The inoculation was by the perforation of leaf veins with pin pick and plant grafting. The inoculated plants were periodically examined to determine the presence of symptoms. Plants of *Arachis pintoi* were collected in the Experimental Station of IAPAR, at Paranavaí, PR. The inoculated species were checked for the presence of *X. fastidiosa* by PCR (polymerase chain reaction) and DAS-ELISA (double antibody sandwich-enzyme-linked assay). The species *A. Pintoi* was tested only by DAS-ELISA. All the plant species included in the study were negative for the presence of the bacterium by PCR. In contrast, the species *A. pintoi*, *Nicotiana tabacum* - TNN, *N. clevelandii*, *N. turkishin*, *Brachiaria decumbens* and *Catharanthus roseus* were positive for the presence of *X. fastidiosa* by DAS-ELISA. None of the inoculated species showed symptoms of infection by *X. fastidiosa*.

Key words: *Xylella fastidiosa*, host range, PCR, DAS-ELISA.

INTRODUÇÃO

O cafeeiro (*Coffea arabica* L.) é uma cultura largamente explorada comercialmente no Brasil. A escaldadura da folha do cafeeiro causada por *Xylella fastidiosa* tem sido associada a grandes prejuízos à cafeicultura (PARADELA FILHO et al., 1995). *X. fastidiosa* é uma bactéria gram-negativa limitada ao xilema de plantas, cujas células apresentam forma de bastonete reto ou ligeiramente curvo (WELLS et al., 1987). A bactéria é responsável por doenças em diversas plantas de interesse agrícola (HOPKINS, 1989). Sintomas como redução de porte devido ao encurtamento de internódios, escaldadura de folhas e frutos pequenos são característicos de plantas infectadas por *X. fastidiosa* (CARLOS et al., 1997). A transmissão de *X. fastidiosa* ocorre principalmente através de insetos vetores, em especial por cigarrinhas da família Cicadellidae (HOPKINS, 1989). Ao se alimentarem do xilema de plantas infectadas, esses insetos adquirem a bactéria e transmitem para outras plantas. Plantas invasoras são um dos fatores que mais afetam a agricultura, exigindo custo para seu controle, competindo com o cafeeiro por nutrientes, água no solo, luz e gás carbônico, e também podem funcionar como reservatórios de pragas e patógenos (LEITÃO FILHO, 1972). Essas plantas se constituem em importantes hospedeiros alternativos para *X. fastidiosa* e reprodução de insetos vetores da bactéria (Hopkins, 1989). O objetivo deste trabalho foi identificar

possíveis hospedeiros alternativos de *X. fastidiosa* entre plantas invasoras em lavouras de cafeeiro e também entre plantas cultivadas.

MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi realizado no Instituto Agronômico do Paraná, em Londrina-PR. Foram semeadas 32 espécies diferentes de plantas. Algumas espécies foram semeadas em tubetes de isopor contendo substrato Plantmax e posteriormente transplantadas para vasos cerâmicos contendo mistura de solo esterilizado. Outras espécies foram diretamente semeadas em vasos cerâmicos, fazendo-se somente o desbaste de plantas. Entre 30 e 60 dias após a germinação de cada espécie, foi realizada a inoculação das plantas. Para isso, foram utilizadas suspensões dos isolados 12762, 12726, 12781, 12968 e 12373 de *X. fastidiosa*, na concentração de 10^8 ufc/mL. A inoculação foi feita através de cinco perfurações com alfinete entomológico nº 02 na nervura central do limbo foliar, em duas folhas de cada planta. A área perfurada recebeu uma gota de 20 µl da suspensão bacteriana. Para cada espécie foram deixadas algumas plantas como testemunhas, recebendo estas uma gota de água destilada. Entre 15 e 20 dias após a primeira inoculação, todas as espécies foram reinoculadas. Alguns vasos contendo plantas de vinca (*Catharanthus roseus*) foram inoculados três vezes, por dois métodos de inoculação. A primeira e a segunda inoculação foram feitas pelo método de perfuração com alfinete entomológico, conforme descrito anteriormente. A terceira inoculação foi feita pelo método de enxertia. Com uma lâmina de bisturi, foi feito um corte em diagonal, de cima para baixo, no caule de cada planta. Uma gota de suspensão bacteriana de *X. fastidiosa* foi colocada no corte, e o caule foi amarrado com fita PARAFILM "M". Após a inoculação, houve o acompanhamento periódico para verificar a manifestação de sintomas característicos de infecção pela bactéria *X. fastidiosa*. Plantas dos cultivares Amarillo, Araçuaí, Engopa e acesso 31-B de amendoim-rasteiro (*Arachis pintoi*) foram coletadas na Estação Experimental do IAPAR, Paranavaí-PR. Testes de PCR e DAS-ELISA foram realizados com as plantas inoculadas e coletadas, para detectar a presença de *X. fastidiosa*, conforme descrito anteriormente (Carvalho et al., 2000).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Plantas de vinca desenvolveram manchas cloróticas foliares e ramos com internódios curtos. No teste de DAS-ELISA, algumas dessas plantas de vinca apresentaram reações suspeitas e positivas, sugerindo estarem infectadas com *X. fastidiosa* (dados não apresentados). No entanto, amostras dessas

mesmas plantas foram submetidas ao teste de PCR e apresentaram resultados negativos (dados não apresentados). Assim, os sintomas exibidos pelas plantas de vinca inoculadas com *X. fastidiosa* podem não ser de infecção pela bactéria. As demais plantas de outras espécies inoculadas com *X. fastidiosa* não manifestaram sintomas de infecção pela bactéria. Com base nos testes de PCR realizados, nenhuma das espécies estudadas apresentou resultados positivos para presença de *X. fastidiosa* (Figuras 1 e 2). Entretanto, no teste de DAS-ELISA foi possível identificar como potenciais hospedeiros alternativos de *X. fastidiosa* as espécies *A. pintoii* (amendoim-rasteiro), *C. roseus* (vinca), *B. decumbens* (braquiária) e as espécies de tabaco *N. clevelandii*, *N. tabacum* - TNN e *N. turkishin*. Embora essas espécies não tenham apresentado sintomas de infecção por *X. fastidiosa*, essas plantas podem servir como hospedeiras alternativas assintomáticas e serem reservatórios da bactéria. Além disso, há possibilidade de cigarrinhas adquirirem a bactéria dessas plantas assintomáticas e transmitirem o patógeno para plantas de cafeeiro.

Tabela 1 - Relação das espécies invasoras utilizadas no estudo

Família	Nome Comum	Nome científico^a
Família Euphorbiaceae	Amendoim-bravo	<i>Ephorbia heterophylla</i> L.
Família Gramineae	Capim-amargoso	<i>Digitaria insularis</i> (L.) Mea ex Ekman
	Capim-braquiária	<i>Brachiaria decumbens</i> Stapf
	Capim-colchão	<i>Digitaria horizontalis</i> Willd.
	Capim-colonião	<i>Panicum maximum</i> Jacq.
	Capim-favorito	<i>Rhynchelytrum repens</i> (Willd.) C.E. Hubb.
	Capim-marmelada	<i>Brachiaria plantaginea</i> (Link) Hitchc.
	Capim-rabo-de-gato	<i>Setaria geniculata</i> (Lam.) Beauv.
Família Amaranthaceae	Caruru-roxo	<i>Amaranthus hybridus</i> L.
	Caruru-de-espinho	<i>Amaranthus spinosus</i> L.
Família Convolvulaceae	Corda-de-viola	<i>Ipomea acuminata</i> Roem. et Schult
Família Compositae	Cosmos	<i>Cosmos bipinnatus</i> Cav.
	Dente-de-leão	<i>Taraxacum officinale</i> Weber
	Ervade-touro	<i>Tridax procumbens</i> L.
	Falsa-serralha	<i>Emilia Sonchifolia</i> DC.
	Serralha	<i>Sonchus oleraceus</i> L.
	Picão-preto	<i>Bidens pilosa</i> L.
Família Malvaceae	Guanxuma	<i>Malvastrum coromandelianum</i> (L.) Garcke
Família Rubiaceae	Poaia-branca	<i>Richardia brasiliensis</i> Gomez
Família Solanaceae	Tabaco	<i>Nicotiana glutinosa</i>
	Tabaco	<i>Nicotiana debneji</i>
	Tabaco	<i>Nicotiana tabacum</i>
	Tabaco	<i>Nicotiana tabacum</i> - TNN
	Tabaco	<i>Nicotiana clevelandii</i>
	Tabaco	<i>Nicotiana bentoniana</i>
	Tabaco	<i>Nicotiana rustica</i>
	Tabaco	<i>Nicotiana turkishin</i>
Família Chenopodiaceae	-	<i>Chenopodium amaranticolor</i>
	Quinoa	<i>Chenopodium quinoa</i>
	-	<i>Physalis floridana</i>
Família Commelinaceae	Trapoeeraba	<i>Commelina benghalensis</i> L.
Família Apocyraceae	Vinca	<i>Catharanthus roseus</i> (L.) G. Don
Família Leguminosae	Xique-xique	<i>Crotalaria lanceolata</i> E. Mey.
	Pega-pega	<i>Desmodium tortuosum</i> (Sw.) DC.
	Amendoim-rasteiro	<i>Arachis pintoii</i>

^aFonte: KISSMAN (1991-1992) e LORENZI (1990).

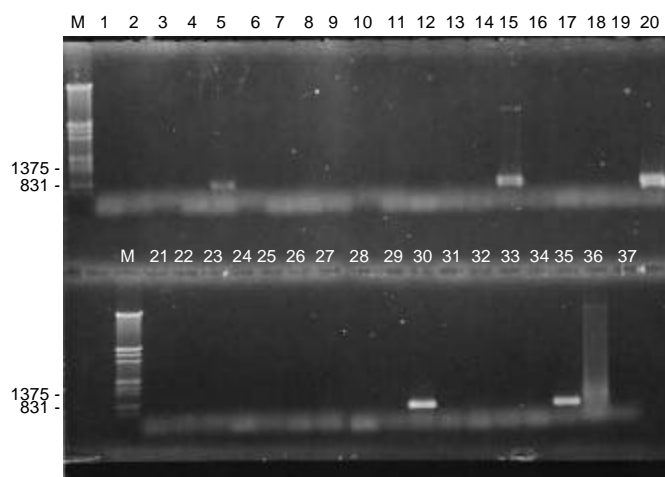


Figura 1 - Amplificação de fragmento de aproximadamente 733 pb do DNA genômico de *X. fastidiosa* utilizando os "primers" RST31 e RST33. M, marcador molecular; linhas 1, 2, 3, 4 e 5, caruru; 6, 7, 8, 9 e 10, dente-de-leão; 11, 12, 13, 14 e 15, *N. debneyi*; 16, 17, 18, 19 e 20, vinca; 21, 22, 23, 24 e 25, capim-colonião; 26, 27, 28, 29 e 30, capim-rabo-de-gato; 31, 32, 33, 34 e 35, poaia-branca; 36, controle positivo; 37, controle negativo. Plantas 1, 6, 11, 16, 21, 26 e 31, não inoculadas com *X. fastidiosa*; plantas 5, 10, 15, 20, 25, 30 e 35, com adição de suspensão bacteriana no processo de extração de DNA.

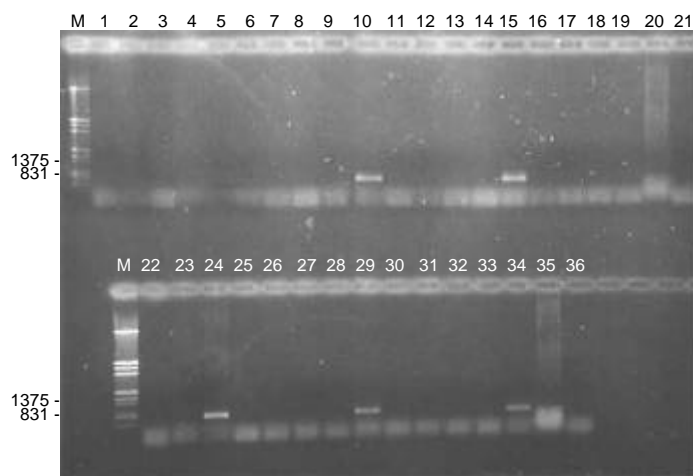


Figura 2 - Amplificação de fragmento de aproximadamente 733 pb do DNA genômico de *X. fastidiosa* utilizando os "primers" RST31 e RST33. M, marcador molecular; linhas 1, 2, 3, 4 e 5, cosmos; 6, 7, 8, 9 e 10, *N. glutinosa*; 11, 12, 13, 14 e 15, falsa-serralha; 16, 17, 18, 19 e 20, *P. floridana*; 21, 22, 23 e 24, corda-de-viola; 25, 26, 27, 28 e 29, capim-braquiária; 30, 31, 32, 33 e 34, capim-colchão; 35, controle positivo; 36, controle negativo. Plantas 1, 6, 11, 16, 21, 25 e 30, não inoculadas com *X. fastidiosa*; plantas 5, 10, 15, 20, 24, 29 e 34, com adição de suspensão bacteriana no processo de extração de DNA.

CONCLUSÕES

Nenhuma das espécies inoculadas apresentou sintomas característicos de infecção por *X. fastidiosa*. Pelo teste de PCR não foi possível identificar a presença de *X. fastidiosa* em nenhuma das espécies estudadas. Pelo teste de DAS-ELISA, as espécies identificadas como potenciais hospedeiras alternativas de *X. fastidiosa* foram *A. pintoii* (amendoim-rasteiro), *C. roseus* (vinca), *B. decumbens* (braquiária) e as espécies de tabaco *N. clevelandii*, *N. tabacum* - TNN e *N. turkishin*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CARLOS, E.F.; NETO, J.R.; BERETTA, M.J.G. A bactéria *Xylella fastidiosa*. In: DONADIO, L. C.; MOREIRA, C. S. (Cords.). **Clorose variegada dos citros**. 1. ed. Bebedouro: FUNDECITRUS, p.22-36, 1997.
- CARVALHO, F.M.S.; MENEGUIM, L; LEITE JR., R.P. Levantamento da distribuição de *Xylella fastidiosa* associada a *Coffea* spp. em regiões cafeeiras do Paraná. In: I Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil. **Resumos Expandidos...** p.287-290. 2000.
- HOPKINS, D.L. *Xylella fastidiosa*: Xylem-limited bacterial pathogen of plants. **Annual Review of Phytopathology**, v.27, p.271-290, 1989.
- KISSMANN, K.G. **Plantas infectantes e nocivas**. 1. ed. São Paulo: BASF Brasileira S. A., v.2, 1991-1992.
- LEITÃO FILHO, H.F. **Plantas invasoras de culturas no Estado de São Paulo**. São Paulo: HUCITEC, v.1, 1972.
- LORENZI, H. **Manual de identificação e controle de plantas daninhas: plantio direto e convencional**. 4. ed., Nova Odessa: Plantarum, 1994.
- PARADELA FILHO, O. et al. Primeira constatação em cafeeiro no Brasil da *Xylella fastidiosa* causadora da Clorose Variegada dos Citros. **Laranja**, Cordeirópolis, v.16, n.2, p.135-136, 1995.
- WELLS, J. M. et al. *Xylella fastidiosa* gen. Nov. sp. nov.: Gram-negative, xylem-limited fastidious plant bacteria related to *Xanthomonas* spp. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v.37, n.2, p.136-143, apr. 1987.