

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
CURSO DE AGRONOMIA**

**METODOLOGIA DE DETECÇÃO E OCORRÊNCIA DE XILELLA FASTIDIOSA
DO CAFEIRO NA REGIÃO DO TRIÂNGULO MINEIRO**

RODRIGO CHOEFI MALUF

Monografia apresentada ao Curso de
Agronomia da Universidade Federal de
Uberlândia, para obtenção do grau de
Engenheiro Agrônomo.

Uberlândia, MG.
Julho de 2000

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
CURSO DE AGRONOMIA**

**METODOLOGIA DE DETECÇÃO E OCORRÊNCIA DE XILELLA FASTIDIOSA
DO CAFEIRO NA REGIÃO DO TRIÂNGULO MINEIRO**

RODRIGO CHOEFI MALUF

PROF. Dr. ARMANDO TAKATSU

Monografia apresentada ao Curso de
Agronomia da Universidade Federal de
Uberlândia, para obtenção do grau de
Engenheiro Agrônomo.

Uberlândia, MG.
Julho de 2000

**METODOLOGIA DE DETECÇÃO E OCORÊNCIA DE XILELLA FASTIDIOSA
DO CAFEIRO NA REGIÃO DO TRIÂNGULO MINEIRO**

APROVADO PELA COMISSÃO EXAMINADORA EM ____/____/____

PROF. Dr. Armando Takatsu
(Orientador)

PROF. Dr. Fernando César Juliatti
(Conselheiro)

PROF. Dr. Fernando Campos Mendonça
(Conselheiro)

Uberlândia, MG.
Julho de 2000

ÍNDICE

1- INTRODUÇÃO.....	05
2- REVISÃO DE LITERATURA.....	07
2.1- Etiologia.....	07
2.2- Ocorrência.....	08
2.3- Sintomatologia.....	08
2.4- Diagnose.....	08
2.5- Controle	09
3- MATERIAL E MÉTODOS.....	10
3.1- Metodologia de detecção de <i>X. fastidiosa</i> ao microscópio óptico e correlação de sintomas com a concentração da bactéria.....	10
3.2- Isolamento de <i>X. fastidiosa</i>	12
3.2.1- Seleção d materiais para isolamento.....	12
3.2.2- Meio de cultura.....	12
3.2.3- Obtenção do extrato do xilema e plaqueamento.....	12
3.2.4- Identificação pelo teste de PCR.....	13
3.2.5- Preservação de <i>X. fastidiosa</i>	15
3.3- Levantamento da distribuição da <i>X. fastidiosa</i>	15
4- RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	17
4.1- Metodologia de detecção de <i>X. fastidiosa</i>	17
4.1.1- Metodologia de exame ao microscópio.....	17
4.1.2- Correlação de sintomas com a concentração bacteriana.....	18
4.2- Isolamento, identificação e preservação de <i>X. fastidiosa</i>	20
4.2.1- Isolamento.....	20
4.2.2- Identificação pelo teste de PCR.....	20
4.2.3- Preservação.....	21
4.3- Levantamento da distribuição da <i>X. fastidiosa</i>	21
5- CONCLUSÕES.....	23
6- REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA.....	24
APÊNDICE.....	28

Resumo

Foi feito um levantamento da ocorrência e distribuição de *X. fastidiosa* nas principais áreas de produção de café das regiões do Triângulo Mineiro utilizando-se como parâmetros para diagnose a formação de galhos com internódios curtos e desfolha acentuada, ocorrência de descoloração nos vasos do xilema e presença de massas de bactérias bastonetiformes finas no líquido do xilema afetado espremido com alicate. A identidade do agente causal como *X. fastidiosa* foi confirmada através de teste de PCR com primers específicos. A presença de massas bacterianas nos extratos do xilema foi considerada como a fase avançada da infecção em que a planta pode apresentar os sintomas de stress hídrico, como desfolha e seca das pontas dos galhos, redução no desenvolvimento e queda na produção. Foi constatada incidência de infecção nesta fase em todos os cafezais, com mais de 10 anos de idade, inspecionados ao acaso. Pela alta incidência e ampla distribuição da doença, pode-se considerar que a *X. fastidiosa* nos cafezais da região não é um fato novo, mas pelo contrário, deve ocorrer há muito tempo sendo um dos responsáveis pelo declínio gradativo que obriga os produtores a renovarem as culturas em períodos cada mais curtos.

1-INTRODUÇÃO

O domínio tecnológico para a exploração agrícola em grande escala dos solos do cerrado é reconhecido mundialmente como uma grande conquista da pesquisa agropecuária brasileira. O desenvolvimento da cafeicultura nas regiões dos cerrados do Triângulo Mineiro e de Alto Paranaíba pode ser considerada como um dos principais resultados desta conquista.

Devido às condições climáticas que favorecem a produção de café de alta qualidade, aliada à utilização de avançada tecnologia de produção, o café do cerrado é considerado como um dos melhores do mundo, alcançando melhores preços e colocações nos mercados internacionais. Entretanto, existem ainda muitos fatores que podem comprometer o desenvolvimento da cafeicultura do cerrado, estando entre estes uma nova doença denominada popularmente como amarelinho (causada pela mesma espécie de bactéria *X.fastidiosa* (WELLS , 1987) que causa o amarelinho ou clorose variegada dos citrus),

Apesar de não existirem dados concretos de danos em cafeeiros, sabe-se que esta doença causa queda acentuada na produção e na qualidade do produto. Se considerarmos os prejuízos causados na citricultura, pode-se considerar a doença como uma grande ameaça para a cafeicultura que pode comprometer todo o sucesso alcançado no desenvolvimento da cafeicultura do cerrado.

A grande maioria das informações disponíveis relacionadas à doença são de dados extrapolados da clorose variegada dos citrus obtidos no Estado de São Paulo.

O presente projeto teve por objetivos:

- a) Desenvolver a metodologia de detecção de *X. fastidiosa* ao microscópio óptico.
- b) Identificar os sintomas efetivamente relacionados com muitas bactérias
- c) fazer o levantamento da real situação da doença nos cafezais dos cerrados da região do Triângulo Mineiro.

2-REVISÃO DA LITERATURA

2.1-Etiologia

X. fastidiosa foi classificada em 1987 por WELLS e colaboradores, tendo sido, por muito tempo, chamada de bactéria do tipo Rickettsia (LEITER JR., 1989). É uma bactéria bastonetiforme, sem flagelos, gram-negativa, aeróbica, de parede celular enrugada e encontrada somente nos vasos do xilema. Apesar de classificada apenas recentemente, desde há muito, causa doenças em diversas culturas. Sua gama de hospedeiras é ampla, muito embora as doenças sejam relatadas notadamente em plantas lenhosas perenes como pêssogo, ameixeira, videira e citros.; (ROSSETI *et al.*, 1990; LARANJEIRA). Estas hospedeiras, no entanto, são afetadas pelas estirpes distintas. Além desse tipo de planta, *X. fastidiosa* tem sido freqüentemente relatada em plantas daninhas, dentro ou nas cercanias de pomares afetados (LARANJEIRA). No Brasil, além de causar a escaldadura das folhas da ameixeira (KITAJIMA *et al.*, 1981), é responsável pela clorose variegada dos citros (CHANG *et al.*, 1993) e pela requeima do cafeeiro (PARADELA FILHO *et al.*, 1995; LIMA *et al.*, 1996). Foi também encontrada em algodoeiro (COLARICHIO *et al.*, 1995), talvez relacionada à doença conhecida por murchamento avermelhado ou “vermelhão”.

A suposição de que o crestamento do cafeeiro é causado pela mesma bactéria da clorose variegada dos citros (PARADELA FILHO *et al.*, 1995) se deve à constatação da

ocorrência do crestamento em cafezais próximos às grandes plantações de citrus infectadas e à reação sorológica positiva com a bactéria da laranjeira. Não há ainda dados concretos de que as duas doenças sejam causadas pela mesma bactéria ou são estirpes diferentes.

2.2-Ocorrência

A *X. fastidiosa* em cafeeiro causando crestamento da folha foi descrita pela primeira vez no Estado de São Paulo (PARADELA FILHO *et al.*, 1995). No ano seguinte, LIMA *et al.*, 1996, constataram a doença em extensas áreas do Leste do Estado de São Paulo e em Guaxupé, Estado de Minas Gerais.

2.3-Sintomatologia

Os sintomas visíveis começam pela formação de entrenós curtos , pelo amarelecimento das folhas semelhante ao causado pela deficiência de zinco, seguindo-se à forma de escaldadura, requeima, desfolha ,seca das partes terminais das ramas e definhamento da planta.

2.4-Diagnose.

A diagnose das doenças causadas por *X. fastidiosa* é feita através do exame direto do líquido extraído do xilema de ramos e de pecíolos ao microscópio ótico comum com a objetiva de 40 X de aumento. (LIMA *et al.*, 1996) , ou do exame da cultura isolada. Diagnose segura é obtida através do teste serológico (BERETA, *et al.*, 1992; LEE *et al.*, 1992) ou de PCR, do extrato do xilema ou da bactéria isolada em meio de cultura (MINSAVAGE *et al.*, 1995).

O isolamento da *X. fastidiosa* é feito em meio especial, sendo os mais indicados o BCYE de WELLS *et al.*, 1987 e Cs-20 (UCHIBABA, *et al.*, 1992; SCHAAD, 1988) e de PWS (BERRETTA *et al.*, 1992).

2.5-Controle

As doenças causadas por *X. fastidiosa*, por se tratar de uma bactéria sistêmica, restrita ao xilema e transmitida apenas por vetores (Hemiptera: Cicadellidae) (PURCELL & HOPKINS, 1996; ROBERTO *et al.*, 1996), seu controle em culturas já estabelecidas é muito difícil (LARANJEIRA *et al.* . 1997).

Devida a estas características, a forma de controle através de cultivares mais resistentes é considerada a mais efetiva em culturas em que esta doença causa danos significativos como de pessegueiro , ameixeira e videira (FRY & MILHOLAND, 1990)

Dentre as laranjas doces (*Citrus sinensis* Osb.) já foi relatado que as mais suscetíveis são a Pêra e a Valência (LARANJEIRA *et al.*, 1995), embora não haja muita variação quanto a perdas (LARANJEIRA *et al.*, 1997).

Em o cafeeiro ainda não há dados efetivos, mas tem-se observado que o Catuaí é o mais afetado pela requeima, do que o Mundo Novo

3-MATERIAL E MÉTODOS

3.1-Metodologia de detecção de *X. fastidiosa* ao microscópio e correlação de sintomas com a concentração da bactéria.

Foi feita uma reavaliação dos sintomas encontrados em cafezais do Triângulo Mineiro coletando-se amostras de galhos com e sem sintomas descritos por PARADELA FILHO ,1995 e LIMA *et al.* 1996. Estes sintomas foram: presença de entrenós curtos , amarelecimento das folhas com característica de deficiência de zinco, crestamento foliar, desfolha acentuada e seca das pontas dos galhos .(Apêndice, Figura 1)

Os materiais foram coletados aleatoriamente, no total de dez amostras por área produtora, de diferentes propriedades situadas ao longo das rodovias Uberlândia - Araguari, Araguari - Distrito de Amanhece e Araguari - Indianópolis.

Em laboratório foi feita a avaliação do escurecimento dos tecidos do xilema no corte das ramas em bisel e da concentração de *X. fastidiosa* nos extratos do xilema em exame ao microscópio.

A intensidade do escurecimento dos tecidos do xilema foi quantificada, dando-se valores de 0 a 3 ,onde 0=sem escurecimento e 3=escurecimento máximo.(Apêndice, Figura 2)

O extrato do xilema foi obtido comprimindo-se com alicate a seção da rama sem córtex, da porção imediatamente inferior à parte verde terminal. O extrato obtido foi misturado com uma gota de lactoglicerina (glicerina 75 ml, ácido láctico 15 ml e água destilada 10 ml) sobre uma lâmina de vidro para microscopia e examinado com a objetiva de 6,5X de aumento.

Considerou-se como resultado positivo quando era observada a presença de massas de coloração castanho clara.(Apêndice, Figura 3) Quando havia dúvidas, estas massas foram examinadas com a objetiva de 40X de aumento e os resultados confirmados se as massas apresentarem estrutura fibrosa ou forem visualizadas células bastonetiformes longas e finas, características típicas de *X. fastidiosa*.

A concentração de *X. fastidiosa* foi quantificada em função do tamanho das massas bacterianas dando-se valores de 1 a 4, sendo 1=massa pequena e 4=massa grande e 2 e 3 intermediárias multiplicado por número destas massas observadas no campo visual em microscópio com a objetiva de menor aumento(6,5X).

Foram analisadas ao todo 50 amostras e feitas as correlações entre a concentração de *X. fastidiosa*, escurecimento do xilema, presença de entrenós curtos e outros sintomas como amarelecimento das folhas, crestamento foliar e desfolha.

Para a comparação da metodologia de detecção de *X. fastidiosa* , foram examinados pelo método de coloração azul de metileno (LIMA *et al.*, 1997), os extratos das amostras positivas e negativas previamente identificadas pelo método de lactoglicerina. Para isso , o

extrato do xilema foi misturado com uma gota de solução de azul de metileno(LIMA *et al.*, 1997) coberto com laminula e examinado com a objetiva de 40X de aumento. Considerou-se como resultado positivo, quando eram visualizados aglomerados de pequenos bastonetes finos e alongados.

3.2- Isolamento, identificação e preservação de *X. fastidiosa*

3.2.1- Seleção de materiais para isolamento.

Para o isolamento de *X fastidiosa* foram coletados galhos com sintomas mais característicos, ou seja com desfolha acentuada e encurtamento dos internódios e escurecimento dos tecidos do xilema. Dos materiais coletados, foram selecionados somente os que apresentaram grande número de massas bacterianas em exame do extrato do xilema ao microscópio.

3.2.2- Meio de cultura

O isolamento foi feito em meio de cultura BCYE de WELLS *et al.*, 1987 modificado contendo os seguintes ingredientes por litro: extrato de levedura, 10g; tampão ACES, 6g; Carvão ativado, 2g; KOH 1N, 17 ml, agar 20g, cisteína, 0,4g; pirofosfato féérico, 0,25g e dextrose 5 g. Os três últimos componentes devem ser esterilizados por filtração e adicionados ao meio após a esterilização em autoclave. A modificação foi feita pela adição de 5g de dextrose , redução do tampão ACES de 10 para 6g e elevação do pH de 6 para 6,5 com adição de 17ml de KOH 1N.

3.2.3- Obtenção do extrato do xilema e plaqueamento

O extrato do xilema foi obtido de secções ou cortes de ramos de aproximadamente 1 cm de comprimento e 4 mm de diâmetro(sem a casca ou córtex), foram retirados da porção

imediatamente anterior à parte terminal verde. Este material foi desinfetados por imersão em álcool e depois, comprimido com alicate, encostando-se um tubo capilar de vidro esterilizado no centro do corte transversal da rama. O extrato do xilema foi succionado naturalmente pela tensão capilar, para o tubo de vidro .

O extrato do xilema foi transferido para a placa de Petri, soprando-se levemente o tubo capilar sobre o meio de cultura. A gota do extrato assim depositado foi espalhado uniformemente com a alça de vidro.

Estas placas de isolamento foram incubadas à temperatura de 25-28oC até 45 dias. Durante este período as placas foram examinadas 2 a 3 vezes por semana para detectar e eliminar as contaminações que ocorrem com bastante frequência. Colônias de bactérias e de fungos contaminantes foram retiradas com um espátula (de aço utilizada para pintura de quadros a óleo) previamente esterilizada com álcool em chama. Quando não era possível retirar o contaminante, transferiu-se a parte do meio de cultura não contaminada para outra placa.

3.2.4- Identificação pelo teste de PCR

O teste de PCR foi realizado no Laboratório de Genética e Bioquímica desta Universidade, com primers específicos Rst 31 e Rst 33 (MINSAVAGE *et al.*, 1998), para confirmar a identidade de três culturas de bactérias isoladas em meio BCYE a partir de materiais coletados na Área Experimental da UFU-Campus de Umuarama, de Araguari e Indianópolis .

O teste foi executado segundo o protocolo de MINSAVAGE *et al.* (1998) e constou de seguintes etapas:

Extração do DNA

- a-Em um tubo de microcentrífuga de 1,5 ml, colocar 300 ul da solução de lise TAE-SDS (Tris -1,21g; ácido acético glacial-0,285ml; EDTA-93mg e água destilada para.50 ml)
- b-Transferir e misturar cuidadosamente 150 ul da suspensão bacteriana levemente turva, preparada com a colônia isolada em meio de BCYE em água destilada.
- c-Incubar os tubos a 65oC por 30 minutos
- d-Tratar com volume igual de solução de clorofórmio-isoamilálcool (24:1)
- e-Centrifugar a 12.000rpm/5 minutos e separar o sobrenadante.
- f-Precipitar o DNA da solução aquosa adicionando-se isopropanol na proporção de 0,6 do volume e incubando-se a -70oC por 15 minutos.
- g-Centrifugar por 20 minutos à temperatura ambiente
- h-Redissolver o pellet de DNA em 50 ul de TE pH 7,4 (Tris-0,121 g ; Água destilada-70 ml; HCl 1 M. até ajustar o pH a 7,4; EDTA sal dissódico-37,2 mg e água destilada para completar100 ml)
- i-Guardar a 4oC

Amplificação do DNA por PCR

A amplificação do DNA foi efetuada no termociclador contendo em cada microtubo (de 500 ul) os seguintes componentes: Tampão de amplificação 10X, 2,5 ul; *Taq*-DNA polimerase 5U/ul, 0,2 ul; Primers (4 pmol), 2,5 ul de cada (5 ul); MgCl₂ (50 mM), 0,75 ul; Água destilada, 12,3 ul; dNTPs (10 mM), 0,25 ul e DNA da amostra, 4 u. A amplificação foi feita em 40 ciclos de PCR de seguintes etapas: desnaturação a 95⁰C por 30s, anelamento do primer a 55⁰ C por 30s, extensão do DNA a 72⁰ C por 45 s, anelamento a 55⁰C por 30s e extensão a 72⁰C por 5 minutos.

O produto do PCR foi extraído com 25ul de clorofórmio-isoamilálcool. A 4⁰C.

Eletroforese em gel de agarose

Para verificar a amplificação do DNA, alíquotas de 15 ul foram transferidas aos poços contendo gel de agarose a 1,2% em TBE 0,5X. e brometo de etídio a 10ug/ml e corrida a 5V/cm por 90 minutos.

A formação de banda foi considerada positiva em função da especificidade dos primers utilizados.

Os produtos do PCR em gel foi visualizado e fotografado sob transilluminator de luz ultravioleta.

3.2.5- Preservação de *X. fastidiosa*

As culturas de *X. fastidiosa* obtidas neste trabalho foram preservadas em freezer de menos 80oC. Para isso, foi feita a suspensão em solução de glicerina a 18 % e acondicionadas em ampolas de vidro seladas com chama de maçarico a gás e oxigênio.

3.3- Levantamento da distribuição da *X. fastidiosa*.

Foram feitas coletas dirigidas de amostras em diferentes propriedades de mais fácil acesso, selecionando-se as culturas ao acaso ao longo das rodovias nos municípios de Araguari, Uberlândia e Indianópolis e coletando-se amostras de galhos com entrenós curtos e desfolha acentuada de 15 a 20 plantas distribuídas dentro da cultura.

A maioria das coletas foram feitas em culturas de mais de 10anos. Entretanto, foram coletadas também de plantações entre 5 a 10 anos e de menos de 5 anos, todas as vezes em que havia sintomas típicos ou duvidosos.

A diagnose dos materiais coletados foi feita através do exame dos extratos do xilema ao microscópio e considerou-se como resultado positivo quando era observada a presença de massas de coloração castanho clara de estrutura fibrosa.(Apêndice, Figura 3)

4- RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1- Metodologia de detecção de *X. FASTIDIOSA*

4.1.1-Metodologia de exame ao microscópio

O método de obtenção do extrato do xilema com alicate mostrou ser eficiente para o exame de grande número de amostras. Entretanto, para o exame de galhos desfolhados com seca das pontas, em que o teor de líquido é muito baixo, devem ser testados outros métodos. Muito provavelmente o de pressão de líquido com seringa usado por LIMA *et al.*, 1997 em material cítrico poderá ser útil para estes casos, apesar de ser um método mais demorado.

O método de lactoglicerina para clarear o extrato do xilema permitiu a visualização e a quantificação rápida da concentração de *X. fastidiosa* em grande número de amostras coletadas para exame em laboratório e mostrou ser muito mais eficiente e rápido do que o de coloração com azul de metileno descrito por LIMA *et al.*, 1997.

O método de coloração com azul de metileno , além de ser um processo mais demorado , colori também incineras partículas contidas no extrato sem uma diferenciação clara da bactéria.

Como a presença das massas bacterianas coincidem com a manifestação de sintomas da doença como escurecimento dos vasos, encurtamento de internódios, desfolha e seca das pontas dos galhos, o método de lactoglicerina mostrou ser útil para diagnosticar a doença no estágio em que doença começa a causar danos na planta.

4.1.2- Correlação de sintomas com a concentração bacteriana

Observando-se os dados das tabelas 1 a 5, pode-se verificar que os sintomas que apresentam correlação com a concentração de *X. fastidiosa* nos líquidos do xilema são o encurtamento dos internódios e o escurecimento do xilema. Amarelecimento e crestamento das folhas, apesar de estarem na descrição dos primeiros relatos da doença (PARADELA FILHO *et al.*, 1995; LIMA *et al.*, 1996) não são freqüentes para caracterizar a doença.

A desfolha e a seca das pontas dos galhos são sintomas muito freqüentes nas plantas afetadas pela *X. fastidiosa*. Entretanto, verificou-se que os galhos, mesmo com alto grau de desfolha, quando não apresentavam encurtamento dos entrenós, não tinham bactérias nos extratos do xilema, não podendo ser, portanto, atribuídas a esta bactéria.

Tabela 1: Detecção de *X. fastidiosa* em 10 amostras coletadas na propriedade de Serafim Perez, Município de Araguari, Distrito de Amanhece. Variedade: Catuaí. Idade da cultura: 13 anos

Amostras	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	% ⁽¹⁾	(2)
Internódios curtos	+	+	+	-	-	+	-	+	-	-	50	
Amarel. Folhas	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	20	
Crest. Foliar	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	10	
Desfolha	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+	70	
Escurec.Xilema 0-3	2	3	2	0	1	3	0	1	1	0	70	1,3
Conc. Bacteriana ⁽³⁾	8	15	6	0	0	20	1	12	3	0	70	6,5

(1) Ocorrência; (2) Nota média (3) Somatório do tamanho da massa bacteriana quantificada de 1 a 4, multiplicada pelo número de massas de cada tamanho.

Tabela 2: Detecção de *X. fastidiosa* em 10 amostras coletadas na propriedade Morada do Sol, Município de Araguari. Variedade: Catuaí Idade da cultura: 13 anos

Amostras	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	% ⁽¹⁾	(2)
Internódios curtos	-	+	-	-	+	+	-	-	+	+	50	
Amarel. Folhas	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	
Crest. Foliar	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	
Desfolha	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	70	
Escurec. xilema 0-3	0	0	0	0	2	3	1	0	3	3	50	1,2
Conc. Bacteriana ⁽³⁾	0	4	0	0	38	8	0	0	11	6	50	6,7

(1) Ocorrência; (2) Nota média (3) Somatório do tamanho da massa bacteriana quantificada de 1 a 4, multiplicada pelo número de massas de cada tamanho.

Tabela 3: Detecção de *X. fastidiosa* em 10 amostras coletadas no Município de Patrocínio. Variedade não identificada e idade da cultura de ± 15 anos

Amostras	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	% ⁽¹⁾	(2)
Internódios curtos	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	50	
Amarel. folhas	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	
Crest. Foliar	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	
Desfolha	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	80	
Escurec. xilema 0-3	0	1	3	3	1	0	2	0	0	0	50	1,0
Conc. Bacteriana ⁽³⁾	2	8	10	15	0	0	12	0	0	2	60	4,9

(1) Ocorrência; (2) Nota média (3) Somatório do tamanho da massa bacteriana quantificada de 1 a 4, multiplicada pelo número de massas de cada tamanho.

Tabela 4: Detecção de *X. fastidiosa* em 10 amostras coletadas na propriedade de Demétrio Cavalaro, Município de Araguari. Variedade Catuaí. Idade da cultura de 12 anos.

Amostras	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	% ⁽¹⁾	(2)
Internódios curtos	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	70	
Amarel. folhas	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	10	
Crest. Foliar	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	
Desfolha	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	90	
Escurec. xilema 0-3	2	2	1	0	3	0	0	0	3	1	60	1,2
Conc. Bacteriana ⁽³⁾	11	4	3	0	14	1	0	1	24	4	80	6,2

(1) Ocorrência; (2) Nota média (3) Somatório do tamanho da massa bacteriana quantificada de 1 a 4, multiplicada pelo número de massas de cada tamanho.

Tabela 5: Detecção de *X. fastidiosa* em 10 amostras coletadas na Rodovia BR 365, Km 30, Município de Indianópolis. Variedade Mundo Novo e Idade da cultura de 15 anos

Amostras	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	% ⁽¹⁾	(2)
Internódios curtos	+	+	-	+	+	+	-	-	+	-	60	
Amarel. folhas	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	20	
Crest. Foliar	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	
Desfolha	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	70	
Escurec. xilema 0-3	0	1	0	2	2	0	0	0	3	1	50	0,9
Conc. Bacteriana ⁽³⁾	1	3	0	11	2	0	0	0	14	6	60	3,6

(1) Ocorrência; (2) Nota média (3) Somatório do tamanho da massa bacteriana quantificada de 1 a 4, multiplicada pelo número de massas de cada tamanho.

4.2- Isolamento, identificação e preservação de *X. fastidiosa*

4.2.1- Isolamento

Nas placas de isolamento as colônias de *X. fastidiosa* começaram a ser visualizadas como pequenos pontos convexos de coloração branca entre 25 a 30 dias. Aos 45 dias as colônias estavam com o diâmetro em torno de 2 mm e foram repicadas para novas placas com o meio de cultura para multiplicação.

A modificação feita no meio de cultura BCYE com a adição de dextrose e elevação do pH permitiu melhor crescimento no volume da massa bacteriana mas não reduziu o tempo para a formação de colônias nos trabalhos de isolamento.

4.2.2- Identificação pelo teste de PCR

Os produtos do PCR dos três isolados testados apresentaram uma banda nítida e uniforme em eletroforese em gel de agarose. Este resultado pode ser considerado como a comprovação da identidade da bactéria isolada como sendo de *X. fastidiosa* em função da especificidade dos primers específicos utilizados.

4.2.3- Preservação

Três isolados de *X. fastidiosa* , identificados como UFU xf1 , UFU xf2 e UFU xf3 , obtidos respectivamente da Área Experimental da UFU , Fazenda Morada do Sol , município de Araguari e Br -Km30, Indianópolis estão preservados a -80C em glicerina a 18% em ampolas de vidro.

4.3- Levantamento da distribuição da *X. fastidiosa*

Os dados obtidos no levantamento da distribuição de *X. fastidiosa* nos cafezais do Triângulo Mineiro estão sintetizados na tabela 6. Cem por cento das amostras coletadas de culturas com mais de 10 anos apresentou resultado positivo em exame ao microscópio. Estes dados não indicam que todas as plantas estavam infectadas porque as coletas foram dirigidas, mas indicam que todas estas culturas de mais de 10 anos selecionadas aleatoriamente em diferentes localidades estavam infectadas. Pela alta incidência e ampla distribuição da doença, pode-se considerar que a *X. fastidiosa* nos cafezais da região não é um fato novo, mas pelo contrário, deve ocorrer há muito tempo sendo um dos responsáveis pelo declínio gradativo que obriga os produtores a renovarem as culturas em período cada mais curto.

A proporção de amostras positivas diminuiu em culturas mais novas (menos de 10 anos), o que indica que a *X. fastidiosa* em cafeeiro é uma doença de evolução muito lenta mas que pode manifestar em culturas relativamente novas. Dados preocupantes, são as de amostras positivas de culturas novas com menos de 5 anos constatadas no trecho Araguari - Distrito de Amanhece. Entre as hipóteses para manifestação precoce dos sintomas, as mais prováveis são a infecção precoce na fase de viveiros ou a infecção com alto potencial de

inoculo por ter sido plantado junto às culturas antigas altamente infectadas quando foi feita a renovação do cafezal, prática esta muito comum entre os cafeicultores.

Tabela 6: Dados do levantamento da distribuição de *X. fastidiosa*

Rodovias	Uberlandia-Araguari			Araguari-Amanhece			Araguari-Indianópolis		
Idade das culturas	> 10 anos	5 a 10 anos	< 5 anos	> 10 anos	5 a 10 anos	< 5 anos	> 10 anos	5 a 10 anos	< 5 anos
Culturas inspecionadas	2	0	0	10	3	3	5	2	2
Total de amostras coletadas	20	0	0	100	30	30	50	20	20
Amostras positivas	20	-	-	100	17	2	50	8	0

5- CONCLUSÕES

- 1) O método de exame do extrato do xilema clarificado com lactoglicerina mostrou ser eficiente para diagnosticar rapidamente grande número de amostras de plantas afetadas por *X. fastidiosa*.
- 2) Os sintomas dos cafeeiros afetados que apresentaram correlação com a concentração de *X. fastidiosa* foram o encurtamento dos entrenódios e escurecimento dos tecidos do xilema.
- 3) A *X. fastidiosa* do cafeeiro se encontram amplamente disseminada no Triângulo Mineiro, afetando em geral plantas com mais de 10 anos de idade.

6- REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

- BERETTA, M.J.G.; LEE, R.F.; DERRICK, K.S.; SANTIAGO OLIVEIRA, J.R.; TOMÉ NETO, J.; RODRIGUES, A.L. & TEIXEIRA, A.R. Remission of citrus variegated chlorosis (CVC) symptoms by treatment with Oxytetracycline. **Summa Phytopathologica** 18(1): 5, 1992.
- CHANG, C.J.; GARNIER, M.; ZREIK, L.; ROSSETI, V. & BOVÉ, J.M. Culture and serological detection of the xylem-limited bacterium causing citrus variegated chlorosis and its identification as a strain of *Xylella fastidiosa*. **Current Microbiology** 27(3): 137-142, 1993.
- COLARICCIO, A.; CHAGAS, C.M. & ALMEIDA, W.P. Presença de bactérias restritas ao xilema (*Gossypium hirsutum* L.) com sintomas de murchamento avermelhado no Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.62(Supl.): 63, 1995.

FRY, S.M. & MILHOLLAND, R.D. Response of resistant, tolerant and susceptible grapevine tissues to invasion by the Pierce's bacterium, *Xylella fastidiosa*.

Phytopathology 80(1): 66-69, 1990.

KITAJIMA, E.W.; MOHAN, S.K.; TSUNETA, M.; BLEICHER, J.; FRENCH, W. & LEITE Jr., R.P. Ocorrência da escaldadura das folhas da ameixeira nos estados de Paraná e Santa Catarina. **Fitopatologia brasileira**, 6: 285 - 292, junho, 1981.

LARANJEIRA, F.F. Controle de doenças causadas por *Xylella fastidiosa*. *Fitopatol. bras.* 22(Suplemento): 224. 1997.

LARANJEIRA, F.F.; POMPEU Jr., J.; GARCIA Jr., A.; VIEIRA, M.; HARAKAVA, R. & BERETTA, M.J.G. Tangelos: highly CVC resistant citrus. **Proceedings of the 5th International Congress of Citrus Nurserymen**, Montpellier, 1997 (no prelo).

LEE, R.F.; BERETTA, M.J.G.; HARTUNG, J.H.; HOOKER, M.E. & DERRICK, K.S. Citrus variegated Chlorosis: confirmation of a *Xylella fastidiosa* as the causal agent. **Summa Phytopathologica** 19(2): 123-125, 1993.

LEITE JR., R.P. Uso do termo bactéria tipo *Rickettsia* em fitobacteriologia. **Fitopatol. Bras.** 14(3/4): 195-197, Outubro/Dezembro, 1989.

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*. **Fitopatologia brasileira** 21(3): 392-393, setembro, 1996.

- LIMA, J.E.O.; MIRANDA, V.S.;ROBERTO, S.R.; COUTINHO, A.; PALMA, R.R.;
PIZOLITTO, A.C. & DE-LIMA, J.E.O. Diagnose da clorose variegada dos citrus por
microscopia ótica. *Fitopatologia Brasileira*, 22(3): 370-374, 1997.
- MINSAVAGE, V.G.; THOMPSON, C.M.; HOPKINS, D.L.; LEITE, R.M.V.B.C. &
STALL, R.E. Development of a polymerase chain reaction protocol for detection of
Xylella fastidiosa in plant tissue. *Phytopathology* 84(5): 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.; HARAKAWA, R.;
RODRIGUES NETO, J. & BERIAM, L.O.S. Primeira constatação em cafeeiro no
Brasil da *Xylella fastidiosa* causadora da clorose variegada dos citros. **LARANJA**
16(2): 135-136, 1995.
- PURCELL, A.H.; . & HOPKINS, D.L. Fastidious xylem-limited bacterial plant pathogens.
Ann. Rev. Phytopathol. 34: 131-151, 1996.
- ROSSETI, V.,GARNIER, M.,BOVÉ, J.M. BERETTA, M.J.G.; TEIXEIRA, A.R.;
QUAGGIO, J.A. & DE NEGRI, J.D. Présence de bactéries dans le xylème d'orangers
atteints de chlorose variégée, une nouvelle maladie des agrumes au Brésil. **C.R. Acad.
Sci. Paris**, t.310, serie III, p.345-349, 1990.
- SCHAAD, N.W. Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria, 2nd.
edition. APSPress. 164 pp. 1988.
- UCHIBABA, E.I.; LEITE Jr. & LEITE, R.M.B.V.C. Avaliação de meios de cultura gerais e
específicos para o cultivo de *Xylella fastidiosa* isolada de ameixeira com escaldadura
da folha. **Fitopatol. bras.** 17: 252-257, 1992.

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(2): 136-143, 1987.

APÊNDICE

Figura: 1: Cafeeiros com sintomas causados por *X. fastidiosa*.

Figura: 2: Escurecimento dos tecidos do xilema causado por *X. fastidiosa* em ramos de cafeeiro

Figura: 3: Massa de *X. fastidiosa* extraída do xilema do cafeeiro