

Produção de material vegetativo de ameixeira (*Prunus salicina*) livre da escaldadura-das-folhas (*Xylella fastidiosa*)

Marco Antonio Dalbó¹, Robson Leandro Hoffman², Daiane Melo³ e Liziane Kadine Antunes de Moraes⁴

Resumo – A escaldadura-das-folhas, causada pela bactéria *Xylella fastidiosa*, é a principal doença da ameixeira (*Prunus salicina*) no Brasil. A utilização de material contaminado tem causado a diminuição da vida útil dos pomares e a disseminação da bactéria nas regiões produtoras. A Epagri/Estação Experimental de Videira iniciou um programa de obtenção e produção de material vegetativo livre de *Xylella fastidiosa* que consiste em um sistema de limpeza pela adição de antibióticos via raiz, em mudas cultivadas em vasos contendo areia e solução nutritiva, seguida de minienxertia dos ápices vegetativos em plântulas de pessegueiro. Foram testados métodos de extração de DNA e iniciadores específicos de *Xylella fastidiosa* para a detecção da presença desta bactéria em material vegetal via PCR (Reação em Cadeia da Polimerase). As plantas livres da bactéria foram mantidas em condições de telado para evitar a recontaminação por insetos vetores e monitoradas continuamente para verificar a sanidade. Após quatro anos de implantação do sistema, as matrizes ainda se mantêm isentas da bactéria.

Termos para indexação: escaldadura, ameixa, DNA, PCR, propagação de plantas.

Production of plum (*Prunus salicina*) vegetative material free of leaf scald (*Xylella fastidiosa*)

Abstract – Leaf scald, caused by *Xylella fastidiosa*, is the main plum (*Prunus salicina*) disease in Brazil. The use of contaminated material has caused a shortening in orchard lifespan and dissemination of the bacteria in all producing regions. A program of obtainance and production of plum vegetative material free of *Xylella fastidiosa* was established at Epagri/Videira Experiment Station. A cleaning system was developed by applying antibiotics to the roots, in plants cultivated in sand culture with nutrient solution, followed by minigrafting of vegetative apex in peach seedlings. Methods of DNA extraction and *Xylella fastidiosa* specific primers were tested in order to determine the most reliable PCR-based detection method. *Xylella*-free plants have been maintained in greenhouse to avoid recontamination by insect vectors and are continuously monitored to verify their sanitary status. Four years after the beginning of this program, tests indicate that the plants are still free of *Xylella fastidiosa*.

Index terms: leaf scald, DNA, PCR, plant propagation.

Introdução

A escaldadura-das-folhas, causada pela bactéria *Xylella fastidiosa* (Wells et al., 1987), é a principal

doença da ameixeira no Brasil e provoca declínio e morte de plantas. Esta bactéria se aloja nos vasos do xilema da ameixeira, onde provoca um bloqueio crônico dos mesmos,

dificultando a translocação da seiva (Figura 1). Não existe tratamento eficiente e a doença está disseminada nas regiões tradicionalmente produtoras. Também não se dispõem

Aceito para publicação em 6/6/2005.

¹Eng. agr., Ph.D., Epagri/Estação Experimental de Videira, C.P. 21, 89560-000 Videira, SC, fone: (49) 3566-0054, e-mail: dalbo@epagri.rct-sc.br.

²Eng. hort., Unoesc – Campus Videira, 89560-000 Videira, SC, fone: (49) 3551-1422.

³Graduando em Ciências Biológicas, Unoesc – Campus Videira.

⁴Eng. agr., M.Sc., UFSC/Centro de Ciências Agrárias, Rod. Admar Gonzaga, 1.346, Itacorubi, 88034-001 Florianópolis, SC, fone: (48) 3331-5300.

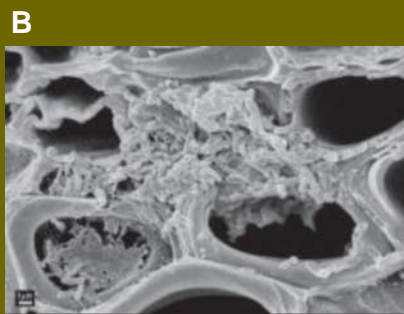


Figura 1. (A) aspecto de planta de ameixeira 'Santa Rosa' com sintomas de escaldadura-das-folhas, causada por *Xylella fastidiosa*; (B) presença de *Xylella fastidiosa* em vasos do xilema

atualmente de cultivares resistentes com boas características para cultivo comercial.

Os vetores responsáveis pela transmissão da *X. fastidiosa* em pomares de ameixeira são cigarrinhas da família Cicadellidae, que se alimentam da seiva das plantas (Ducroquet et al., 2001). Outro meio de disseminação da bactéria é a utilização de material propagativo contaminado que resulta na implantação de pomares com mudas contaminadas. Esta situação é bastante comum e tem contribuído para a disseminação da doença especialmente em áreas anteriormente isentas.

O plantio de mudas isentas de *Xylella fastidiosa*, além de reduzir a disseminação da doença, pode acrescentar alguns anos de vida útil ao pomar em áreas onde a bactéria é endêmica. O efeito benéfico do uso de material livre desta doença é difícil de precisar e depende da variedade e das condições locais. Entretanto, é o principal fator de manejo atualmente disponível para viabilizar economicamente o cultivo da ameixeira.

O uso de mudas livres de *Xylella* ainda é limitado, em parte pelo desconhecimento dos produtores, mas principalmente pela pouca disponibilidade de mudas de qualidade. Em razão disso, foi estabelecido na Epagri/Estação Experimental de Videira – EEV – um programa de produção de matrizes das principais

cultivares de ameixeira livres de *Xylella fastidiosa*. Para isso, foram feitas algumas adaptações das metodologias existentes, principalmente as desenvolvidas para citros, as quais serão descritas neste artigo.

Este trabalho foi desenvolvido pela necessidade de criar um sistema rápido e seguro de limpeza de material vegetativo de um número grande de variedades, principalmente os decorrentes do programa de melhoramento genético conduzido na Epagri/EEV. Com o objetivo de facilitar a diagnose e aumentar a sua eficiência, foram testados e avaliados métodos alternativos via PCR.

Basicamente, um programa de obtenção, manutenção e distribuição de material de ameixeira livre de *Xylella* consiste nas seguintes etapas:

- Obtenção (limpeza) do material vegetativo.
- Manutenção de plantas matrizes oriundas do processo de limpeza em telado para evitar recontaminação.
- Estabelecimento de um sistema de diagnóstico laboratorial da presença da bactéria para monitoramento contínuo do material.

Obtenção de material propagativo livre de *Xylella*

A eliminação de uma bactéria limitada ao xilema, como a *X.*

fastidiosa, é teoricamente mais fácil do que de outros patógenos endofíticos, como os vírus, por exemplo, que vivem dentro das células do hospedeiro. Entretanto, a termoterapia, seguida de microenxertia de ápices, comumente usada para vírus, tem sido também usada para limpeza de *Xylella*. O tratamento térmico de estacas a 50°C também possibilitou a obtenção de material livre desta doença em ameixeira (Moraes et al., 2001).

Para uso na Epagri/EEV, montou-se um sistema de limpeza utilizando antibióticos via raiz para atingir o xilema da planta, onde a bactéria se aloja. Em seguida os ápices, supostamente livres, foram enxertados sobre plântulas de pessegueiro. A enxertia tem sido feita com segmentos apicais de 1cm de comprimento, o que foi considerado como minienxertia.

A etapa inicial do processo é a obtenção de mudas das variedades de ameixeira a serem limpas, feitas por enxertia de mesa com material dormente sobre porta-enxerto de pessegueiro. Essas mudas foram plantadas em vasos contendo areia lavada. Os vasos foram regados duas vezes por semana com 1L de solução nutritiva (2g/L), contendo os antibióticos tetraciclina e estreptomicina, a 0,5g/L do produto comercial Agrimicina. Quando as brotações atingiram cerca de 10cm de comprimento, foi feita a retirada dos ápices (supostamente livres da bactéria) para a realização das minienxertias sobre "seedlings" de pessegueiros (Figuras 2 e 3).

A ação dos antibióticos foi demonstrada num teste em que se comparou a sua adição ou não na solução nutritiva em mudas de material sabidamente contaminado. Com a adição de antibióticos houve maior crescimento inicial dos enxertos (Figura 4), indicando que a absorção via raiz teve ação sobre a bactéria. Foi observado que a enxertia de segmentos de ápices maiores (cerca de 2cm) também resultou em plantas isentas de *Xylella*. Entretanto, o uso de segmentos de caule maiores, que facilitaria a enxertia, precisa ainda ser melhor avaliado. Embora teoricamente a obtenção de material livre da bactéria possa ser feita de modo mais simples, o sistema de ▶

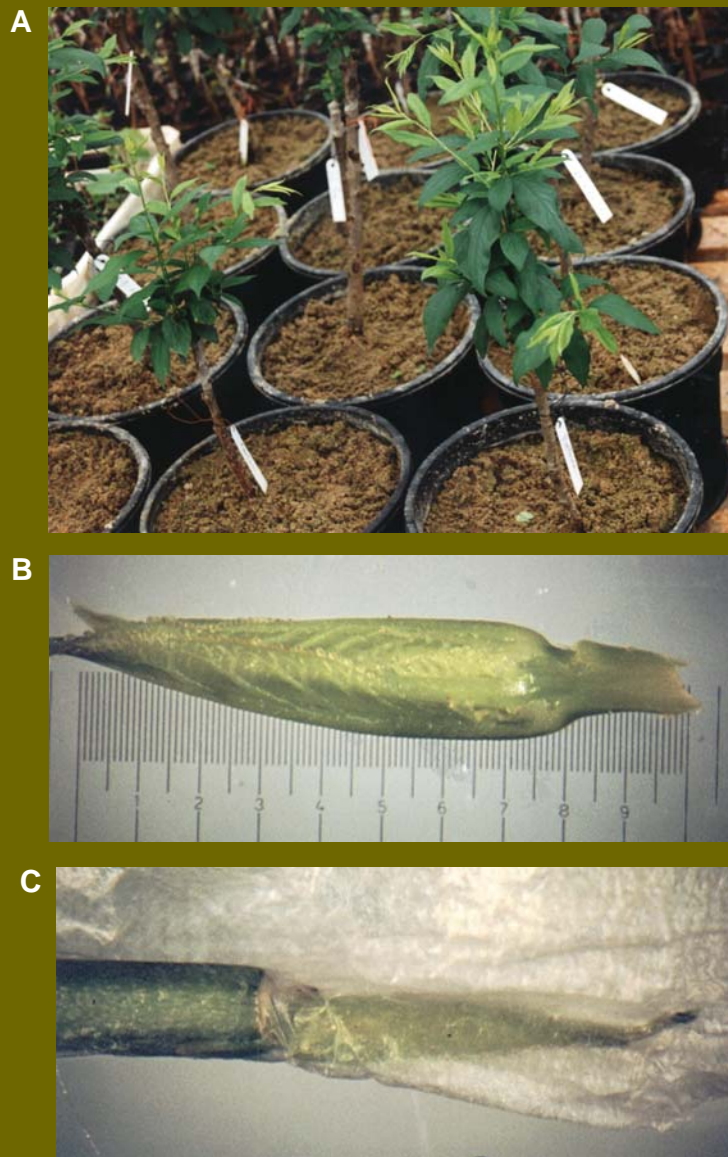


Figura 2. Detalhes da realização de minienxertia em ameixeira. (A) plantas cultivadas em vasos com areia; (B) ápice vegetativo utilizado como enxerto; (C) aspectos da minienxertia recém-feita, com revestimento de Parafilm® para proteger contra o dessecação

minienxertia aqui descrito passou a ser empregado rotineiramente por ter se mostrado eficaz em todos os casos analisados.

Para algumas cultivares tradicionais, foi feita a introdução de material livre originário da Embrapa Clima Temperado, Pelotas, RS.

Manutenção de plantas matrizes em telado

As plantas foram mantidas em estufa com cobertura plástica e com tela antiaáfideo nas laterais, visando

impedir a entrada de insetos vetores (cigarrinhas) que pudessem recontaminar o material, e em vasos de 15 a 20L, com o objetivo de proporcionar um bom crescimento das plantas e, conseqüentemente, uma boa produção de material propagativo (Figura 3).

Diagnose de *Xylella fastidiosa*

Para a certificação de um material livre de *X. fastidiosa* é necessário dispor de um método de análise preciso, sensível e com

baixíssima margem de erro. O tipo de erro mais preocupante é o chamado falso negativo, em que se conclui que o material está livre da bactéria quando na realidade não está. Outras características desejáveis da metodologia de análise são o baixo custo, de modo a permitir o monitoramento contínuo do material, e a reprodutibilidade dos resultados, permitindo a análise de diferentes partes da planta, em diferentes épocas e por diferentes pessoas.

A detecção de *X. fastidiosa* é geralmente feita por métodos sorológicos (Elisa) ou por PCR (Reação em Cadeia da Polimerase). Este último é considerado o mais sensível e, por essa razão, foram concentrados neste método os esforços para definir uma metodologia de certificação do material.

Na reação de PCR, um segmento de DNA é amplificado múltiplas vezes através da enzima DNA polimerase, de modo que se torna visível por fluorescência após eletroforese em gel de agarose. A reação é dependente da presença de dois segmentos de DNA de fita simples (iniciadores ou “primers”), que são o ponto de partida para a enzima realizar a síntese da fita de DNA complementar ao DNA molde (da bactéria, neste caso). A especificidade da reação é dada pelos iniciadores que representam seqüências únicas do genoma da bactéria. Desta forma, a reação só vai ocorrer se o DNA da bactéria estiver presente na amostra.

Iniciadores específicos para a *Xylella* já foram desenvolvidos (Minsavage et al., 1994; Pooler & Hartung, 1995). Entretanto, os melhores resultados para facilidade de amplificação foram obtidos com os iniciadores desenvolvidos por Rodrigues et al. (2003) (Xfas67-85; Xfas1439-1457). Também foram satisfatórios os iniciadores RST31 e RST33 (Minsavage et al., 1994).

O ponto mais crítico para a detecção de *Xylella* via PCR parece ser a qualidade do DNA extraído. Substâncias contaminantes, tais como polifenóis e polissacarídeos, podem inibir a reação de PCR e produzir resultados do tipo falso-negativo. O material de ameixeira é

rico nestes compostos, que são difíceis de ser eliminados no processo de extração do DNA.

Os métodos de extração de DNA de plantas descritos na literatura são em geral variações do método de Doyle & Doyle (1990), que utiliza o detergente CTAB como extrator. No laboratório da Epagri/EEV foram testadas algumas variações do método de extração, que incluem etapas adicionais para a retirada de contaminantes. Entretanto, não foi possível chegar a um protocolo de extração de DNA que evitasse totalmente os resultados falso-negativos.

Os melhores resultados foram obtidos com o uso de kits comerciais de extração baseados na adsorção de DNA em microlunas com sílica (Plant DNeasy minikit, Quiagen). Embora a nossa experiência tenha se limitado a algumas dezenas de amostras, todas as plantas supostamente contaminadas a campo que foram analisadas deram resultados positivos. Do mesmo modo, os materiais recebidos como livres da bactéria foram analisados e deram resultados negativos. Esta metodologia passou a ser então utilizada como padrão, tanto para monitoramento das matrizes como para diagnose de *Xylella* em amostras enviadas por produtores de ameixeira que desejavam verificar o estado sanitário do material vegetativo. O uso dos kits resulta em um acréscimo significativo no custo de análise, porém implica em maior confiabilidade dos resultados.

Um exemplo de resultado de análise feita conforme a metodologia relatada anteriormente pode ser visto na Figura 5, onde é mostrado um gel de agarose após a realização de eletroforese para separação de DNA em função do tamanho do segmento amplificado. Quando o DNA da bactéria está presente na amostra, a reação de PCR (“primers”: Xfas67-85 e Xfas1439-1457) resulta na amplificação de um segmento de DNA com cerca de 1.400 pares de bases, cuja sequência é específica de *X. fastidiosa*. Na ausência da bactéria, a banda de DNA correspondente não aparece. Também, nesse caso, aparece a amplificação de um segmento de DNA específico de ameixeira (um

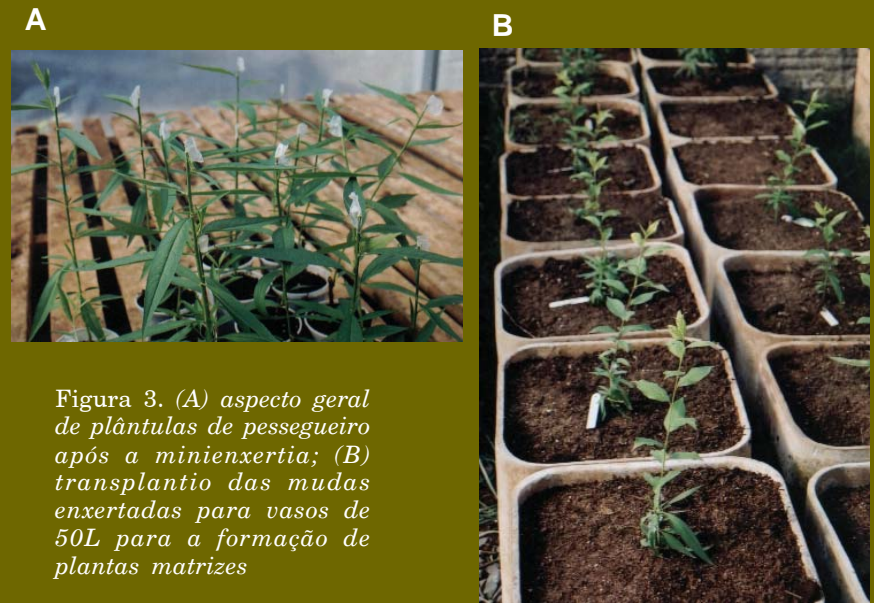


Figura 3. (A) aspecto geral de plântulas de pessegueiro após a miniinocultiva; (B) transplântio das mudas enxertadas para vasos de 50L para a formação de plantas matrizes

marcador do tipo microssatélite) que serve para verificar se a reação de PCR ocorreu normalmente também em amostras isentas da bactéria. A inclusão de iniciadores específicos para ameixeira ajuda a identificar casos de falso-negativos por falhas na reação de PCR.

Situação atual

Atualmente estão sendo mantidas plantas matrizes de 15 cultivares comerciais e 13 seleções avançadas do programa de

melhoramento genético de ameixeira da Epagri. As plantas mais velhas já têm quatro anos e não foi detectada recontaminação por *Xylella fastidiosa*.

A metodologia estabelecida tanto para limpeza quanto para detecção da bactéria é confiável, em função dos resultados no presente estudo. Em atendimento aos produtores, poderá ser fornecido material vegetativo (borbulhas) de ameixeira isento de *X. fastidiosa* e realização de testes de detecção da presença de *X. fastidiosa*.



Figura 4. Efeito da adição de antibióticos na solução nutritiva sobre o crescimento inicial de mudas de ameixeira ‘Simka’, feitas a partir de material contaminado. (A) com; (B) sem antibióticos

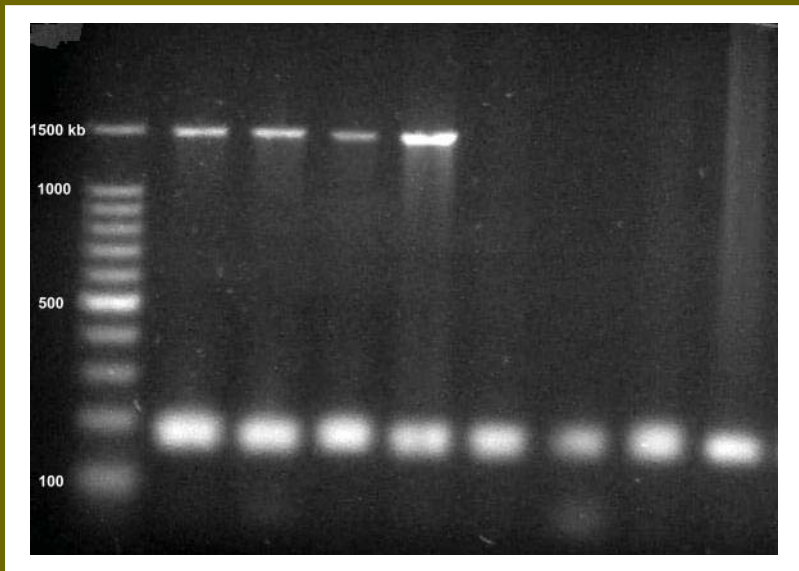


Figura 5. Resultado de eletroforese em gel de agarose referente a teste de detecção de *Xylella fastidiosa* via PCR em pecíolos de ameixeira. As amostras 1, 2, 3 e 4, que apresentam uma banda correspondente a um segmento de DNA de cerca de 1.400 pares de bases (pb), estão contaminadas pela bactéria. As demais representam resultado negativo para o teste. A banda de cerca de 180pb refere-se a uma seqüência específica de ameixeira e foi incluída como controle

Literatura citada

1. MORAES, E.A.; BARBOSA, W.; BERETTA, M.J.A.G.; VEIGA, R.F.A. Eliminação de *Xylella fastidiosa* em três cultivares de ameixeira por termoterapia. In: REUNIÃO ANUAL DO INSTITUTO BIOLÓGICO, 14., 2001,

São Paulo, SP. Resumos... São Paulo: Instituto Biológico, 2001. R. 13. Publicado no Arquivo do Instituto de Biologia, v. 68 (Supl.), 2001.

2. DOYLE, J.J.T.; DOYLE, J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, v.12, p.13-18, 1990.

3. DUCROQUET, J.P.H.J.; ANDRADE, E.R. de; HICKEL, E.R. *A escaldadura das folhas da ameixeira em Santa Catarina*. Florianópolis: Epagri, 2001. 55p. (Epagri. Boletim Técnico, 118).

4. MINSAVAGE, G.V.; 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*, v.84, p.456-461, 1994.

5. POOLER, M.R.; HARTUNG, J.S. Specific PCR detection and identification of *Xylella fastidiosa* strains causing Citrus Variegated Chlorosis. *Current Microbiology*, v.31, p.317-381, 1995.

6. RODRIGUES, J.L.M.; SILVA-STENICO, M.E.; GOMES, J.E.; LOPES, J.R.S.; TSAI, S.M. Detection and Diversity Assessment of *Xylella fastidiosa* in Field-Collected Plant and Insect Samples by Using 16S rRNA and *gyrB* Sequences. *Applied and Environmental Microbiology*, v.69, n.7 p.4.249-4.255, 2003.

7. WELLS, J.M.; RAJU, B.C.; HUANG, H.Y.; WEISBURG, W.G.; MANDELCO, P.L.; BRENNER, D.J. *Xylella fastidiosa* gen. nov.; gram negative, xylem limited fastidious plant bacteria related to *Xanthomonas* spp. *International Journal of Systematic Bacteriology*, v.37, p.130-143, 1987. ■



As pesquisas da Epagri com maçãs permitiram reduzir em até 70% a aplicação de fungicidas, diminuindo sensivelmente os riscos de contaminação do agricultor, do consumidor e do meio ambiente.