

COMUNICAÇÃO CIENTÍFICA

AValiação DA RESISTÊNCIA À *Xylella fastidiosa* EM GERMOPLASMA DE TANGERINA E HÍBRIDOS INTRODUZIDOS DA ITÁLIA E CórSEGA¹

ELENA PAOLA GONZÁLEZ JAIMES², PAULO SERGIO DE SOUZA²,
ESTER WICKERT², LUIZ CARLOS DONADIO³.

RESUMO - A Clorose Variegada dos Citros (CVC), causada pela bactéria *Xylella fastidiosa*, é atualmente uma das doenças que mais afeta a citricultura brasileira, sendo as variedades de laranja-doce as mais afetadas. Ensaio instalado na Estação Experimental de Bebedouro (EECB), em condições de estufa, teve como objetivo avaliar o comportamento em relação à CVC de germoplasma de citros introduzidos pela EECB, Fundecitrus e Cenargen. Os materiais foram multiplicados sobre diversos porta-enxertos e, quando atingiram o tamanho adequado, inoculados por garfagem lateral de ramo doente. Cada variedade constou de quatro plantas, três das quais foram inoculadas, e a outra sem inocular deixada como padrão. As avaliações consistiram na observação de sintomas, teste de ELISA e PCR. Os primeiros sintomas nos materiais contaminados começaram a surgir 7 meses após a inoculação. Encontraram-se 18 variedades positivas no teste de PCR, o que indica sua suscetibilidade à bactéria *Xylella fastidiosa*. Entretanto, as variedades que foram detectadas pelo teste ELISA e não pelo PCR não foram contadas como suscetíveis e, sim, como falsos positivos.

Termos de indexação: citros, CVC, inoculação, bactéria.

RESISTANCE EVALUATION TO *Xylella Fastidiosa* OF TANGERINE GERMOPLASM AND HIBRIDOS INTRODUCEDS FROM ITALY AND CORSE

ABSTRACT - The Citrus Variegated Chlorosis (CVC), caused by the *Xylella fastidiosa* bacteria is one of the most important diseases that affect the Brazilian citriculture, been the sweet orange the most susceptible to the bacteria. The objective of this experiment, carried out in the Bebedouro Experimental Station (EECB) in greenhouse conditions, was the evaluation of the behavior of citrus germplasm introduced by the EECB, Fundecitrus and Cenargen, in relation to the CVC. The plants were multiplied over several rootstocks and when they achieved the right size were inoculated by grafting of diseased stem. Each material had four plants, three of them were inoculated and the other one wasn't inoculated, leaving like control. The plants were evaluated by symptoms presence, ELISA and PCR tests. The first symptoms in the contaminated materials appeared 7 months after inoculation. Eighteen materials were found positives in the PCR test, showing that this materials are susceptible to the *Xylella fastidiosa*. However, the materials where the bacteria was reported by the ELISA, but not by the PCR test, were grouped like false positives and weren't were accepted like susceptible.

Index terms: CVC, inoculation, bacteria, citrus.

A Clorose Variegada dos Citros (CVC) foi constatada pela primeira vez no Brasil, em 1987, na região Noroeste do Estado de São Paulo (De Negri, 1993). Em levantamentos realizados pelo FUNDECITRUS, no Estado de São Paulo, tem sido verificado o aumento da porcentagem de plantas com CVC, sendo que, no censo de 2000, observou-se que 13,23% das árvores estavam com sintomas foliares da doença; 20,8% com sintomas em folhas e frutos, o que perfaz um total de 34,03% de árvores infectadas; deste total, 44,44% tem de 6–10 anos e 42,69% de 3-5 anos (FUNDECITRUS, 2000).

O agente causal desta doença é a bactéria *Xylella fastidiosa*, que é restrita ao xilema. É uma bactéria endofítica parasita que habita exclusivamente os elementos de vasos ou traqueídeos constituintes do xilema da planta-hospedeira (Purcell & Hopkins,

1996). Esta bactéria tem como vetores para sua disseminação algumas espécies de cigarrinhas da família Cicadellidae, sendo que esta também pode ser transmitida através da enxertia de borbulhas contaminadas, fato comprovado por Li (1997). A rápida disseminação da bactéria deve-se ao material propagativo contaminado, e uma vez introduzida na área, as cigarrinhas disseminam a doença para outras plantas.

A CVC ataca quase todas as variedades comerciais de laranja-doce no Brasil (Lee et al., 1992). Li et al. (1996), estudando 128 variedades e clones de laranja-doce, encontraram que estas começaram a apresentar sintomas três meses após a inoculação por enxertia, tanto dentro como fora de estufa, sendo os resultados dos testes sorológicos positivos.

Uma das maneiras de controle da CVC seria a utilização

1 (Trabalho 024/2001). Recebido: 22/01/2001. Aceito para publicação: 06/06/2002. Projeto Financiado pela FAPESP N° 98/16240-9.

2 Pós-graduandos em Agronomia, FCAV/UNESP, Via de acesso Prof. Paulo Castellane, s/n, CEP 14884-900, Jaboticabal, SP. e-mail: paolagon@fcav.unesp.br

3 Eng^o Agr^o Prof. Dr. Departamento de Produção Vegetal da FCAV/UNESP - Jaboticabal, SP.

de variedades resistentes, mas, apesar de o Brasil ter um dos maiores bancos de germoplasma, não foi encontrada até o momento nenhuma variedade comercial de laranja-doce resistente ou tolerante a esta doença (Mourão Filho et al., 1997).

Este trabalho teve como objetivo avaliar o comportamento de genótipos introduzidos de bancos de germoplasma de outros países, com respeito a sua resposta à inoculação da bactéria causadora da CVC, pelos métodos sorológico (ELISA) e molecular (PCR).

O experimento foi conduzido na Estação Experimental de Citricultura de Bebedouro (E.E.C.B.), Bebedouro - SP, em estufa com telado antiafídico nas laterais e cobertura de plástico. Estudaram-se genótipos de tangerina e híbridos introduzidos via borbulha sadia pela EECB, FUNDECITRUS e CENARGEN de bancos de germoplasma da Itália e Córsega, sendo utilizada a laranja - Pêra como padrão. Cada material constou de 4 plantas, três das quais foram inoculadas com a bactéria e a outra, sem inocular, utilizou-se como testemunha. Os materiais avaliados estão relacionados na Tabela 1.

As borbulhas dos materiais, retiradas de plantas sadias que se encontram na EECB, foram enxertadas em diversos porta-enxertos relacionados na Tabela 1, em novembro de 1998. Após um mês aproximadamente, as fitas plásticas foram retiradas e o porta-enxerto podado para induzir o crescimento da copa a ser estudada; entretanto, as plantas não apresentaram um crescimento uniforme, sendo que, durante o ano de 1999, foi necessário refazer alguns enxertos. As plantas desenvolveram-se em sacos plásticos de 4 litros (tamanho 15x30cm), com substrato à base de solo (65% de terra areno-argilosa, 20% de esterco de curral, 10% de vermiculita, 3% de orgânico humificado, 1% de superfosfato simples, 0,5 % de calcário dolomítico) e 0,5% de NPK (12-06-12).

Os ramos infectados com a bactéria foram obtidos de plantas da variedade Pêra, com sintomas típicos da doença nas folhas e nos frutos. Os ramos utilizados pertenciam à brotação de um ano de idade com 4 cm de comprimento e 3 a 4 folhas, sendo cortados da planta, e a inoculação era feita no mesmo dia. O método utilizado para a inoculação nas plantas foi o da garfagem lateral de ramos de plantas doentes (Li, 1997). As avaliações dos sintomas da CVC iniciaram-se três meses após a inoculação, segundo o indicado por Li (1997). Esta avaliação foi feita mensalmente, da primeira à terceira vegetação, observando a presença ou não de sintomas nas folhas.

O primeiro teste sorológico DAS -ELISA (Double Antibody Sandwich Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) foi realizado quando as plantas completaram 9 meses após a inoculação e o segundo no mês de outubro de 2000. Os extratos foram preparados a partir de 5 folhas adultas da primeira vegetação de cada planta de citros. Para a realização do teste, no laboratório da FUNDECITRUS, foi utilizado o anticorpo contra *Xylella fastidiosa* produzido por Sanofi Diagnostics Pasteur - France (kit ELISA para diagnóstico de CVC).

A avaliação pelo teste de PCR (Polymerase Chain Reaction) foi realizada no mês de outubro de 2000, utilizando-se do mesmo material usado no teste de ELISA. O procedimento de extração do DNA foi feito com o protocolo proposto por Shillito & Saul (1998). A quantificação do DNA foi realizada em espectrofotômetro (BECKMAN - DU 640), medindo-se a absorvância em contraste com uma amostra de TE, nos compri-

mentos de onda de 260 e 280 nm. Para estimar a quantidade dos DNAs, utilizou-se o padrão de que uma unidade de densidade óptica (DO) equivale a 50 µg de DNA por mL de solução (Sambrook et al., 1989). Para a reação da PCR, utilizou-se o primer RST 31 e RST 33. O teste foi realizado no laboratório de Bioquímica e Microorganismos de Plantas da UNESP/FCAV-Jaboticabal.

Durante o desenvolvimento do experimento, as plantas não apresentaram um crescimento uniforme, sendo que, durante o ano de 1999, foi necessário refazer alguns enxertos dos materiais-copas, assim como em muitos materiais foi preciso fazer uma ou duas reinoculações devido ao baixo índice de pegamento do ramo doente. Este fato fez com que as avaliações fossem feitas em épocas diferentes. A baixa taxa de pegamento foi reportada anteriormente por Souza et al. (2000) e Nunes (1999), este último citando uma taxa de pegamento das inoculações ao redor de 30 a 40%. Estas baixas taxas podem ocorrer, em primeiro lugar, porque os ramos que estão sendo usados para inoculação, correspondem aos mais afetados pela bactéria (para assegurar, assim, uma boa quantidade inicial do inóculo para a infecção), fato que pode estar impedindo o bom pegamento dos ramos. Outro fator que poderia estar influenciando o baixo pegamento dos ramos, é o efeito dos porta-enxertos.

Os primeiros sintomas, embora muito fracos, apareceram 7 meses após a inoculação, no mês de setembro de 1999, no material OMO 30; em novembro de 1999, ou seja, 9 meses após a inoculação, estes foram observados nos materiais OMO 15 e OTA 29.

Todos os materiais foram submetidos ao teste de ELISA, nove meses após a inoculação, sendo os resultados apresentados na Tabela 1. Assim, no primeiro teste realizado, em outubro de 1999, foram avaliados 14 materiais, encontrando-se resultados positivos em plantas que não apresentaram sintomas, como é o caso dos materiais OMO 14 e OMO 29. Os materiais OMO 30, OMO 15 e OTA 29, que haviam apresentado sintomas da doença nas folhas, também apresentaram resultado positivo no teste. No mês de abril de 2000, o teste foi aplicado em outros 15 materiais, os quais foram inoculados no mês de julho de 1999, encontrando-se resultados positivos para os materiais Mandarine Encore SRA 190, OMO 31, OTA 28 e OTA 15. Estes três últimos começaram a apresentar sintomas 8 meses após a inoculação. No mês de agosto de 2000, foi feito o teste nos materiais que haviam sido inoculados no mês de dezembro de 1999. Nestes materiais, nenhuma planta apresentou sintomas da doença, nem a bactéria foi detectada no teste. A não-detecção da bactéria, neste caso, demonstra a necessidade do uso de uma técnica mais precisa quando a concentração da bactéria é baixa, como é o PCR.

Nunes (1999) reportou que, nas avaliações feitas 10 e 11 meses após a inoculação, o número de plantas em que a bactéria foi detectada, foi maior do que em plantas aos 7 meses após a inoculação. Assim, o autor encontrou que plantas com 219 dias após inoculação não apresentavam resposta positiva ao PCR; entretanto, aos 305 dias após a inoculação, 66% das plantas avaliadas foram positivas para a presença de *X. fastidiosa*. No mesmo trabalho, mas em outro ensaio, encontrou-se que, 143 dias após a inoculação, 52,5% das plantas foram positivas, embora dessas plantas apenas 25% apresentassem sintomas de CVC, e aos 170 dias, 90% das plantas apresentaram resultados positivos pelo PCR e 80% destas plantas apresentaram sintomas visuais da doença. Neste caso, o material avaliado foi laranja-Pêra.

TABELA 1 - Resultado de avaliações de sintomas de CVC, teste de ELISA e PCR, em diferentes combinações copa/porta-enxerto de citros.

Nº	MATERIAL	PORTA-ENXERTO	SINTOMAS		TESTE DE ELISA		PCR
			1ª avaliação	2ª avaliação	1ro teste	2do teste	
1	Mandarine Antillaise SRA 497 (Cór)	Laranja China	*	-	*	+	-
2	Mandarine Encore SRA 190 (Cór)	Citrange IVIA	-	-	+	-	-
3	Mandarina Ampefy SRA 495 (Cór)	Citrange IVIA	-	-	-	-	-
4	Mandarine Rodeking SRA 431 (Cór)	Citrange IVIA	-	-	-	-	-
5	Mandarine Natal Tightskin SRA 481 (Cór)	Citrange IVIA	-	-	-	-	-
6	Mandarine Temple Sue Linda SRA 467(Cór)	Citrange IVIA	-	-	-	-	-
7	Mandarine C 54 SRA 337 (Cór)	Citrange IVIA	-	-	-	-	+
8	Mandarine À Peau Lisse SRA 267 (Cór)	Citrange IVIA	-	-	-	-	-
9	Mandarine Leбом SRA 425 (Cór)	Torregrosa IVIA 103-6	-	-	-	-	-
10	Satsuma Panache SRA 579 (Cór)	Citrange IVIA	-	-	-	+	+
11	Satsuma Miyagawa SRA 444 (It)	Citrange IVIA	-	-	-	-	-
12	Satsuma Salzara SRA 341 (Cór)	Nova IVIA 747	-	-	-	-	-
13	Clementina Oroval SRA 335 (Cór)	Citrange IVIA	-	-	-	+	+
14	Clementina Tomotera SRA 535 (Cór)	Laranja Comuna IVIA 105	-	-	-	+	+
15	Clementina IVIA 355 (Cor)	Laranja Comuna IVIA 105	-	-	-	-	-
16	Clementina Reina SRA 534 (Cór)	Laranja Comuna IVIA 105	-	-	-	-	-
17	Clementina Bruna SRA 531 (Cór)	Laranja Comuna IVIA 105	-	-	-	+	+
18	Clementina Caffin SRA 385 (Cór)	Laranja Comuna IVIA 105	-	-	-	-	++
19	Clementina de Nules VCR (It)	Laranja Comuna IVIA 105	-	-	-	-	-
20	Clementina Commune SRA 92 (Cór)	Laranja Comuna IVIA 105	-	-	-	-	-
21	Berna Feret IVIA 336 (Cor)	Laranja Comuna IVIA 105	-	-	-	-	-
22	Tangelo Mapo SRA 450 (Cór)	Laranja Comuna IVIA 105	-	-	-	-	-
23	Tangor H-56 SRA 465 (Cór)	Laranja Comuna IVIA 105	-	-	-	-	-
24	Tangelo Allspice SRA 327 (Cór)	Laranja Comuna IVIA 105	-	+	-	-	+
25	OMO 24 (It)	Tangor Dweet IVIA C-165	-	-	-	+	+
26	OMO 15 (It)	Tangor Dweet IVIA C-165	+	-	++	-	-
27	OMO 12 (It)	Tangor Dweet IVIA C-165	-	-	-	-	-
28	OMO 30 (It)	Tangor Dweet IVIA C-165	+	+	+	+++	+
29	OMO 29 (It)	Tangor Dweet IVIA C-165	-	+	+	+	+
30	OMO 14 (It)	Tangor Dweet IVIA C-165	-	-	+	-	+
31	OMO 28 (It)	Tangor Dweet IVIA C-165	-	-	-	-	-
32	OMO 31 (It)	Torregrosa IVIA 103-6	+	+	+	+	+
33	OMO 17 (It)	Torregrosa IVIA 103-6	-	-	-	-	+
34	OMO 16 (It)	Nova IVIA 747	-	-	-	-	-
35	OMO 22 (It)	Laranja S. Mamede	-	-	-	-	+
36	OMO 13 (It)	Laranja Prata da Ponte	-	-	-	-	-
37	Pomelo Ray Ruby SRA 604 (Cór)	Citrange IVIA	-	-	-	-	-
38	OTA 29 (It)	Laranja Tua Ponte	++	+	++	+	-
39	OTA 12 (It)	Laranja Tua Ponte	-	-	-	-	-
40	OTA 14 (It)	Laranja Tua Ponte	-	-	-	++	-
41	OTA 35 (It)	Laranja Tua Ponte	-	-	-	-	-
42	OTA 28 (It)	Laranja Tua Ponte	+	-	+	-	-
43	OTA 11 (It)	Laranja Tua Ponte	-	-	-	-	-
44	OTA 15 (It)	Laranja Tua Ponte	+	++	++	++	++
45	OTA 23 (It)	Laranja Tua Ponte	-	-	-	-	-
46	OTA 32 (It)	Laranja Tua Ponte	-	-	-	-	-
47	OTA 34 (It)	Comuna IVIA 105	*	-	*	++	+
48	OTA 27 (It)	Laranja Prata da Ponte	-	-	-	-	+
49	OTA 33 (It)	Mineola x P. trifoliata	-	-	-	-	-
50	PÊRA	Limão Cravo	-	-	-	-	-

OTA: (Clementina x Laranja Tarocco), OMO: (Clementina x Laranja Moro), It: Itália, Cór: Córsega; - planta sem sintomas e nas quais não foi detectada a bactéria; + planta com sintomas ou positiva; * planta sem avaliar. Cada sinal corresponde a uma planta.

Souza et al.(2000) encontraram que, em algumas variedades introduzidas, os sintomas começaram a surgir 8 meses após a inoculação, divergindo dos resultados obtidos por Li (1997) e He (1998), que verificaram a presença de sintomas 3 meses após a inoculação.

No mês de outubro de 2000, todas as plantas foram submetidas a uma nova análise de ELISA e a uma de PCR, com a finalidade de se fazer uma última avaliação do material e comparar os resultados dos testes. Nesta avaliação, foram encontra-

dos como positivos para o teste de ELISA e PCR os materiais OMO 30, OMO 31, OMO 29 e OTA 15, nos quais a bactéria já havia sido detectada no primeiro teste. Em Satsuma Panache SRA 579, Clementina Oroval SRA 335, Clementina Tomatera SRA 535, Clementina Bruna SRA 531, OMO 24 e OTA 34, a bactéria não havia sido anteriormente detectada por ELISA, porém estes materiais apresentaram resultado positivo para ambos os testes, ELISA e PCR, fato que pode estar indicando que, nestes materiais, a concentração da bactéria aumentou nos últimos meses ou

que o teste anterior não foi o suficientemente acurado. Alguns materiais apresentaram resultados positivos só para PCR, como no caso de Mandarine C 54 SRA 337, Clementina Caffin SRA 385, Tangelo Allspice SRA 327, OMO 22, OMO 17, OMO 14 e OTA 27, sugerindo que este teste é mais preciso que o teste de ELISA. Os materiais Mandarine Encore SRA 190, Mandarine Antillaise SRA 497, OTA 28, OMO 15 e três plantas do material OMO 30 (no qual só uma planta foi positiva ao PCR e apresentou sintomas) foram reportados como positivos no teste de ELISA, mas não foram detectados pelo PCR. Este resultado pode levar a duas suposições: a primeira é que sejam falsos positivos, resultado este que corrobora os resultados de Souza et al., (2000) e que confirma a pouca sensibilidade e confiabilidade deste teste para a detecção da bactéria. A segunda suposição é que, no caso do material OMO 15, o primeiro teste de ELISA foi realizado onze meses antes do segundo e pode ter ocorrido que, durante este tempo, a bactéria não conseguiu manter-se na planta e, por isto, agora, não foi detectada. Para laranja-Pêra, esperava-se obter sintomas mais rapidamente, mas após 15 meses de inoculação, não foi observada a sintomatologia característica, e os resultados nos testes de ELISA e PCR foram negativos. Provavelmente, não ocorreu uma boa colonização da bactéria, não sendo suficiente para ser detectada pelos testes.

Em todos os casos, os materiais utilizados como testemunha não apresentaram sintomas, e a bactéria não foi detectada, o que confirma não haver nenhuma outra fonte de inoculação nos materiais.

As conclusões preliminares deste trabalho são as seguintes:

- Para a detecção da bactéria, no caso de estudos de inoculação, é preciso recorrer ao teste molecular de PCR, que apresenta resultados mais confiáveis, por ser mais preciso que o teste sorológico de ELISA.

- Os materiais que foram positivos no teste de PCR podem ser considerados como suscetíveis à *Xylella fastidiosa*.

- Os primeiros sintomas foram detectados após 7 meses da inoculação.

AGRADECIMENTOS

À Estação Experimental de Citricultura de Bebedouro, pela colaboração no desenvolvimento do ensaio.

Ao Laboratório da Fundecitrus onde foram feitos os testes de ELISA.

Ao Laboratório de Bioquímica de Microorganismos e Plantas da FCAV/UNESP – Jaboticabal, pela possibilidade de realizar o teste de PCR.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

DE NEGRI, J.D.; GARCIA JR, A. Sugestões para o manejo de pomares com clorose variegada dos citros. **Laranja**, Cordeirópolis, v.14, n.1, p.255-67, 1993.

FUNDECITRUS. página web: www.fundecitrus.com.br Estatísticas CVC. 2000.

HE, CH. **Método rápido de avaliação de Clorose Variegada dos Citros**. 1998. 84f. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 1998.

LEE, R.F. et al. Development of a serological assay for citrus variegated chlorosis - a new disease of citrus in Brazil. **Proceedings of the Florida State Horticultural Society**, Wrinter Haven, v. 105, p.32-34, 1992.

LI, W. B. et al. Resistance or tolerance of citrus species and varieties to citrus variegated chlorosis. In: **INTERNATIONAL CITRUS CONGRESS**, 1996.

LI, W.B. **Avaliação do comportamento de variedades de copas e porta-enxertos à clorose variegada dos citros**. 1997. 55f. Tese (Doutorado em Produção Vegetal) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 1997.

MOURÃO FILHO, F.A.A. et al. Melhoramento dos citros para resistência à CVC. In: DONADIO, L.C., MOREIRA, C.S. **Clorose variegada dos citros**. Bebedouro; 1997. p. 54-72.

NUNES, W.M: **Epidemiologia da Clorose Variegada dos Citros (CVC) avaliada por sintoma e diagnóstico serológico e molecular de *Xylella fastidiosa***. 1999. 144f. Tese (doutorado em Agronomia/Proteção de plantas) Faculdade de Ciências Agrárias. Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 1999.

PURCELL, A.H.; HOPKINS, D.L. Fastidious xylem-limited bacterial plant pathogen. **Annual Review Ver. of Phytopathology**, Palo Alto, v.34, p. 131-151, 1996.

SAMBROOK, J. et al. **Molecular cloning: a laboratory manual**, 2 ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, Cold spring Harbor, 1989.

SHILLITO R.D. SAUL M.W. Protoplast Isolation and Transformation. In: **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, – p 181, 1988.

SOUZA, P.S., et al. Avaliação de alguns genótipos de citros em relação à Clorose Variegada dos Citros (CVC) **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 22, n. 2, p. 148-152, 2000.