

ISSN 1516-8840

Novembro, 2010

*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Clima Temperado
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

Documento 324

Protocolo para diagnóstico de escaldadura das Folhas da Ameixeira

Luis Antônio Suita de Castro

Embrapa Clima Temperado
Pelotas, RS
2010

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Clima Temperado
BR 392 Km 78
Caixa Postal 403, CEP 96010-971- Pelotas, RS
Fone: (53) 3275-8199
Fax: (53) 3275-8219 – 3275-8221
Home Page: www.cpact.embrapa.br
e-mail: sac@cpact.embrapa.br

Comitê Local de Publicações

Presidente: Ariano Martins de Magalhães Júnior
Secretária - Executiva: Joseane Mary Lopes Garcia
Membros: Márcia Vizzotto, Ana Paula Schneid Afonso, Giovani Theisen, Luis Antônio Suita de Castro, Flávio Luiz Carpena Carvalho, Christiane Rodrigues Congro, Regina das Graças Vasconcelos dos Santos.
Suplentes: Isabel Helena Verneti Azambuja e Beatriz Marti Emygdio.

Supervisão editorial: Antônio Luiz Oliveira Heberlê
Revisão de texto: Bárbara Chevallier Cosenza
Normalização bibliográfica: Fábio Lima Cordeiro
Editoração eletrônica e arte da capa: Aline Borges Bach (estagiária)

1ª edição
1ª impressão (2010): 50 exemplares

Todos os direitos reservados

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei N° 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) Embrapa Clima Temperado

Castro, Luis Antonio Suita de
Protocolo para diagnóstico de escaldadura das folhas da ameixeira / Luis Antonio Suita de Castro – Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2010.
22 p. – (Embrapa Clima Temperado. Documentos, 324).

ISSN 1516-8840

1. Ameixa – Doença. 2. Escaldadura – *Xylella fastidiosa*. Título. II. Série.

CDD 634.22

Autores

Luis Antônio Suita de Castro

Eng. Agrôn., M.Sc., Pesquisador da Embrapa

Clima Temperado,

Pelotas, RS,

luis.suita@cpact.embrapa.br

Agradecimentos

Ao funcionário aposentado da Embrapa Clima Temperado, Sr. Arthur Henrique Foerstnow (in memoriam), por sua amizade e pela realização das ilustrações desse trabalho.

Aos funcionários do Laboratório de Imunologia e Microscopia Eletrônica, Nara Eliane Moreira Rocha e Valter Lopes Abrantes, pelas atividades desenvolvidas que forneceram subsídios para a realização dessa publicação.

Apresentação

Um dos problemas mais sérios que interferem no cultivo da ameixeira constitui-se na enfermidade denominada escaldadura das folhas por atuar, drasticamente, sobre a produção de frutos e na longevidade do pomar. Considera-se que o diagnóstico precoce da bactéria responsável pelo problema, em plantas matrizes ou em mudas antes do plantio, constitui-se na forma mais eficiente de minimizar o problema.

A Embrapa Clima Temperado tem possibilitado aos produtores, viveiristas e técnicos avaliar a sanidade de plantas de ameixeira, tornando mais seguros os investimentos realizados com esta cultura. A metodologia utilizada é bastante simples, entretanto necessita que os procedimentos básicos sejam criteriosos durante todo o processo, principalmente em relação à coleta de amostras para realização dos testes.

Nesta publicação são abordados aspectos referentes à importância desse problema em relação à ameixeira e sobre o procedimento utilizado no laboratório de Imunologia e Microscopia da Embrapa Clima Temperado, dando-se ênfase especial ao processo de amostragem. Desta forma busca-se dar maior segurança aos investimentos realizados pelos produtores de ameixas, incentivando a implantação de novos pomares.

Waldyr Stumpf Junior
Chefe Geral
Embrapa Clima Temperado

Sumário

Metodologia do teste de indexação.....	13
Amostragem de plantas matrizes ou plantas de pomares comerciais com mais de um ano	15
Processo de amostragem de mudas	17
Recomendações gerais	19
Interpretação dos resultados.....	19
Custos das análises.....	19
Referências	20

Introdução

Os pomares de ameixeira no sul do País têm enfrentado sérios problemas, principalmente relacionados à sanidade das plantas. A “escaldadura das folhas” é causada por um tipo de bactéria que se localiza no lenho da planta, denominada *Xylella fastidiosa*, destacando-se entre as principais doenças que afetam a ameixeira (CASTRO; DANIELS, 1994; CASTRO et al., 2003).

Os sintomas se manifestam, normalmente, entre meados de janeiro e fevereiro, caracterizando-se por um leve amarelecimento nos bordos da folha (clorose marginal) evoluindo, posteriormente, para o secamento desta mesma região (necrose marginal) (Figura 1), com conseqüente queda de folhas, morte de ramos e, finalmente, morte da planta. Deve-se salientar que, embora os sintomas foliares só ocorram em ameixeiras com mais de três anos de idade, é possível que a planta já esteja enferma desde a época em que foi realizada a enxertia, devido ao material propagativo estar infectado (CASTRO, 1995; CASTRO; SILVEIRA, 2002).



Foto: Luis Antônio Suita de Castro

Figura 1: Sintomas foliares de escaldadura das folhas da ameixeira, causadas pela bactéria *Xylella fastidiosa*.

Como é de conhecimento geral, a importância da muda em fruticultura é inquestionável. Várias atividades de pesquisa e desenvolvimento têm o objetivo de incentivar melhorias no processo de produção de novas plantas partindo da utilização de material propagativo de alta qualidade (NAKA, 2002; MADAIL et al, 2007). É essencial, no caso de viveiristas, que se tenha o conhecimento pleno do estado fitossanitário da matriz de onde será retirado o material propagativo a ser enxertado. Matrizes saudáveis aumentam a segurança de que as mudas que estão sendo produzidas, e com as quais serão implantados pomares, irão se desenvolver adequadamente (CASTRO; SILVEIRA, 2002).

O diagnóstico da escaldadura das folhas da ameixeira baseado apenas

no aparecimento de sintomas não é preciso, porque podem ocorrer anomalias muito semelhantes às ocasionadas por *Xylella fastidiosa*, mas que têm causas variadas, ou a bactéria pode estar presente em concentrações muito baixas e a planta ainda não apresentar a sintomatologia característica. A dificuldade em determinar se as mudas estão ou não infectadas faz com que muitos produtores procurem outras opções para seus pomares, embora existam várias recomendações técnicas para a ameixeira relacionadas a tratamentos culturais, cultivares e até mesmo ao uso de material propagativo de alta sanidade (FACHINELLO, 2000; SIMONETTO et al., 2007; CASTRO et al., 2008).

A Embrapa Clima Temperado possui tecnologia que permite determinar se as mudas ou plantas plenamente desenvolvidas de ameixeira apresentam-se contaminadas, por meio da análise, em laboratório, de folhas ou fragmentos de ramos coletados em qualquer época do ano.

Com o objetivo de tornar este procedimento mais acessível aos produtores e facilitar o encaminhamento de amostras para testes de indexagem, está sendo disponibilizado o método normalmente utilizado em avaliações de rotina com ênfase no procedimento de coleta das amostras, que pode ser realizada diretamente pelo produtor, em seu pomar ou viveiro.

Metodologia do teste de indexação

Vários métodos têm sido utilizados na diagnose de doenças transmitidas vegetativamente como, por exemplo, a inoculação em plantas indicadoras, microscopia ótica e eletrônica, sorologia e técnicas de biologia molecular. Entretanto, na indexação de patógenos, cujo agente causal é amplamente conhecido ou em avaliações de rotina, o teste mais recomendado constitui-se no teste ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay). Inicialmente descrito por Clark e Adams

(1977), foi aperfeiçoado por inúmeros pesquisadores durante as últimas décadas, tendo como vantagem permitir o diagnóstico de muitas enfermidades com precisão e rapidez.

No diagnóstico de *Xylella fastidiosa*, o Laboratório de Imunologia e Microscopia Eletrônica da Embrapa Clima Temperado tem utilizado técnicas de sorologia para diagnósticos de rotina. O procedimento básico consistiu no método ELISA, seguindo-se recomendações específicas determinadas pela empresa fornecedora dos antissoros. O antissoro utilizado é periodicamente adquirido da empresa alemã Loewe Biochemicals, com as seguintes especificações: kit para *Xylella fastidiosa* = antissoro catálogo nº 07119S/500; controle positivo cat. nº 07119PC; controle negativo cat nº 07119NC.

O procedimento consta das seguintes etapas: a) adição de 200 microlitros de gama globulina, diluída em tampão carbonato, em cada orifício das placas de microtitulação, sendo incubadas na temperatura de 37 °C durante quatro horas. Posteriormente, as placas são lavadas três vezes com tampão PBS-Tween, em intervalos de três minutos, para retirada do excesso do material de cobertura (processo normal de lavagem). b) adição de 200 microlitros do extrato da amostra a testar em cada orifício das placas de microtitulação, incubando-as sob refrigeração (4 °C), durante o período de 18 horas, seguindo-se o processo normal de lavagem, para retirada do excesso de material acrescentado; c) adição de 200 microlitros do conjugado diluído em tampão PBS-Tween + PVP/40 + albumina de ovo em cada orifício das placas, incubando-as durante quatro horas, à temperatura de 37 °C. O excesso do material é lavado, seguindo-se o processo normal; d) adição de 200 microlitros do substrato p-nitrofenol fosfato em cada orifício das placas mantendo-as em temperatura ambiente (aproximadamente 25 °C), no escuro, durante 90 minutos, para desenvolvimento da cor característica das reações; e) Avaliação dos resultados colorimétricos (Figura 2) em leitora de placas de microtitulação a 405 nanômetros.

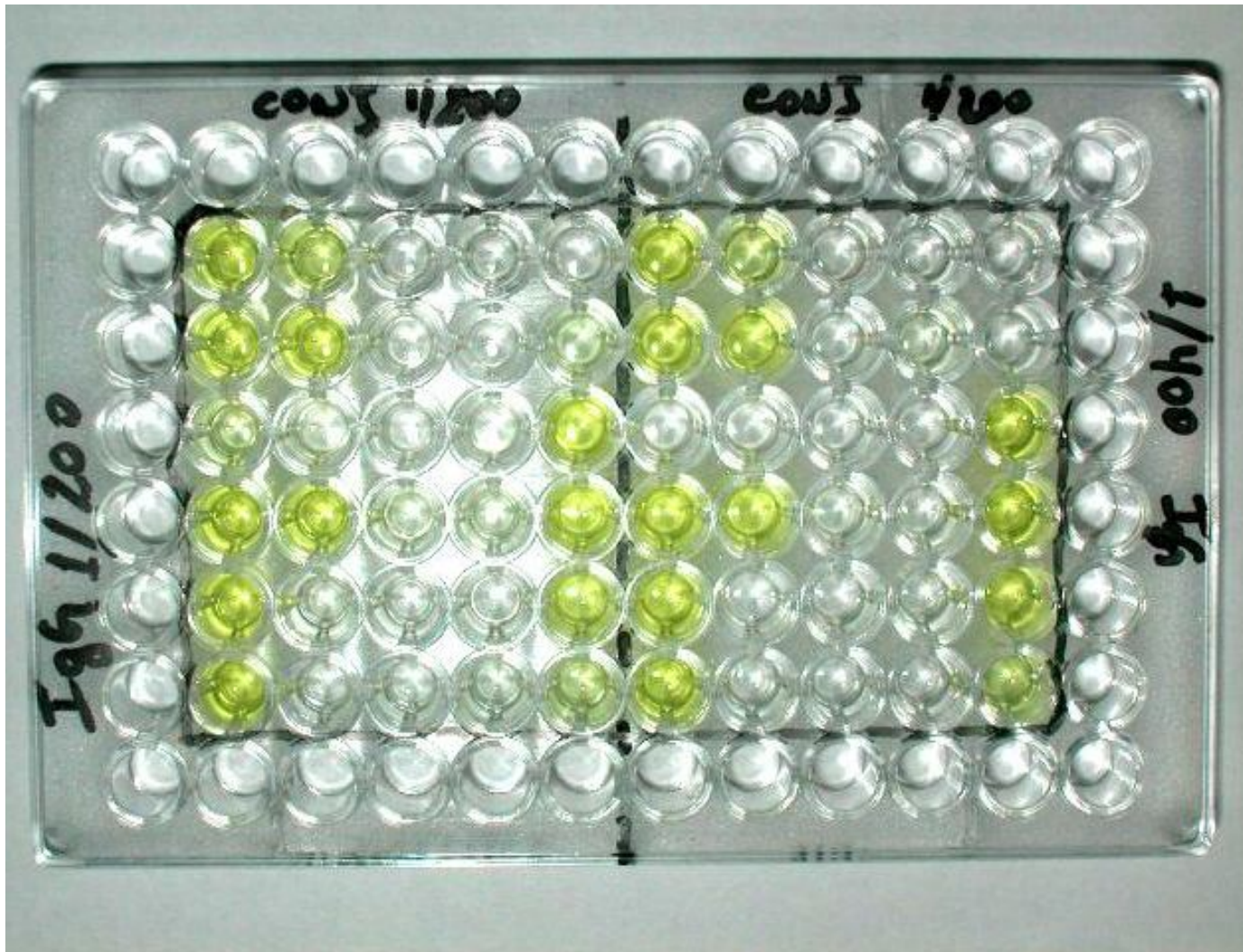


Foto: Luis Antônio Suita de Castro

Figura 2: Placa de microtitulação utilizada no teste imunológico ELISA, permitindo observar a reação de cor que ocorre no final do procedimento, determinando amostras infectadas (orifícios de cor amarela) e não infectadas (orifícios transparentes).

Amostragem de plantas matrizes ou plantas de pomares comerciais com mais de um ano

Em ambos os casos, são retirados quatro ou cinco ramos localizados em torno da copa (Figura 3). Quando for necessário coletar amostras durante o período vegetativo das plantas, é importante que os ramos amostrados sejam do ano anterior aos ramos que estão em crescimento. As amostras devem estar constituídas por fragmentos desses ramos, tendo aproximadamente 10 centímetros de comprimento e 8 milímetros de diâmetro, desprovidos de folhas (Figura 4), envolvidos em papel úmido (jornal, papel toalhas, etc.), identificados

adequadamente (nome do produtor/cultivar/nº da amostra) e colocados no interior de sacos plásticos com as extremidades fechadas. Este tipo de amostragem tem a vantagem de poder ser realizado em qualquer época do ano e permitir a conservação do material por período de tempo relativamente longo (7 a 10 dias), propiciando que seja remetidos de locais distantes, utilizando-se o serviço de correio.

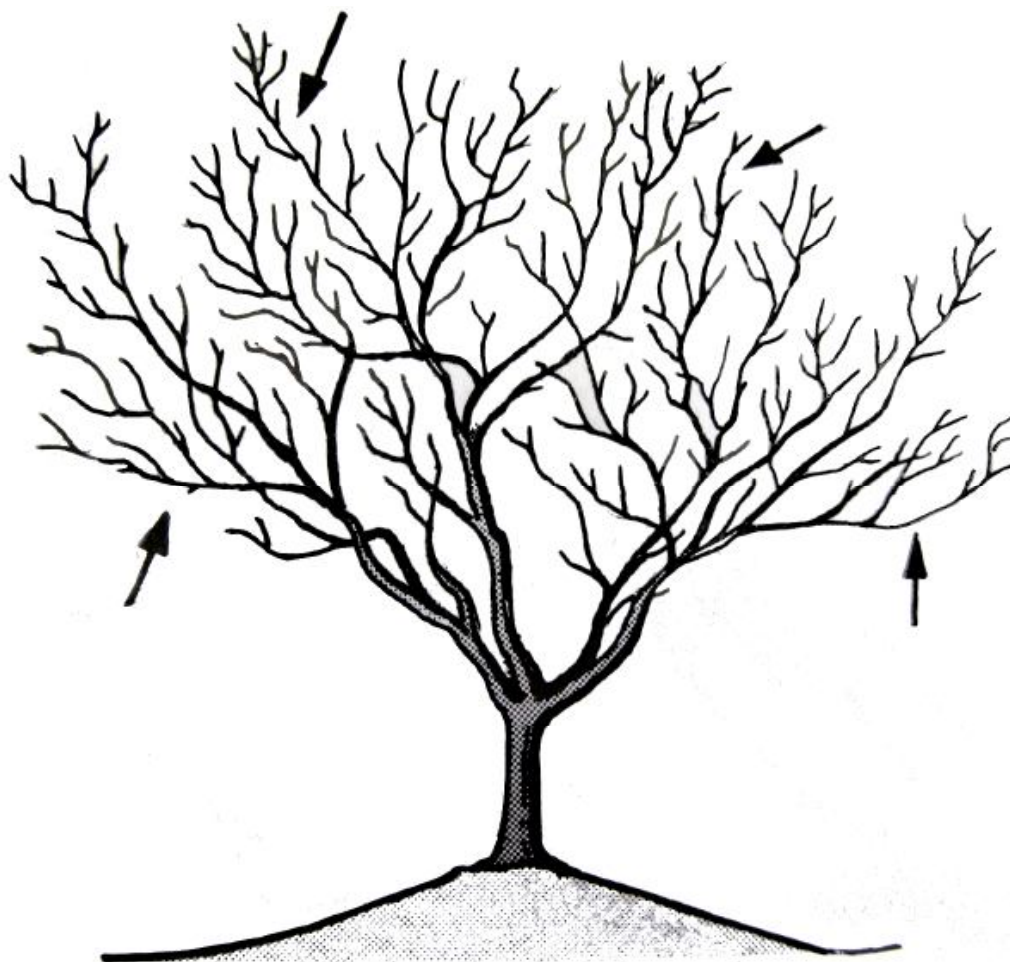


Ilustração: Arthur Henrique Foerstnow

Figura 3: Locais da copa de onde devem ser retirados os segmentos de ramos para análise de *Xylella fastidiosa*.



Ilustração: Arthur Henrique Foerstnow

Figura 4: Quantidade e dimensões dos fragmentos de ramos adequados à análise de *Xylella fastidiosa*.

Processo de amostragem de mudas

No caso de mudas, que ainda estão no viveiro, é aconselhável que sejam utilizadas folhas como amostras. Neste caso, coletam-se de oito a dez folhas, com pecíolos, na porção inferior da planta, ligadas à haste principal (Figura 5). A época ideal de coleta desse tipo de amostra é próximo ao arranquio da muda, pouco antes da queda das folhas.

Todas as amostras deverão ser identificadas individualmente (nome do produtor/cultiva/número da amostra), colocadas em saco plástico com a extremidade completamente fechada e remetidas para análise.

Este tipo de amostragem tem a desvantagem de necessitar que o material coletado seja analisado em curto espaço de tempo. É aconselhável, portanto, que cheguem ao laboratório logo após a coleta (dois ou três dias depois, no máximo).

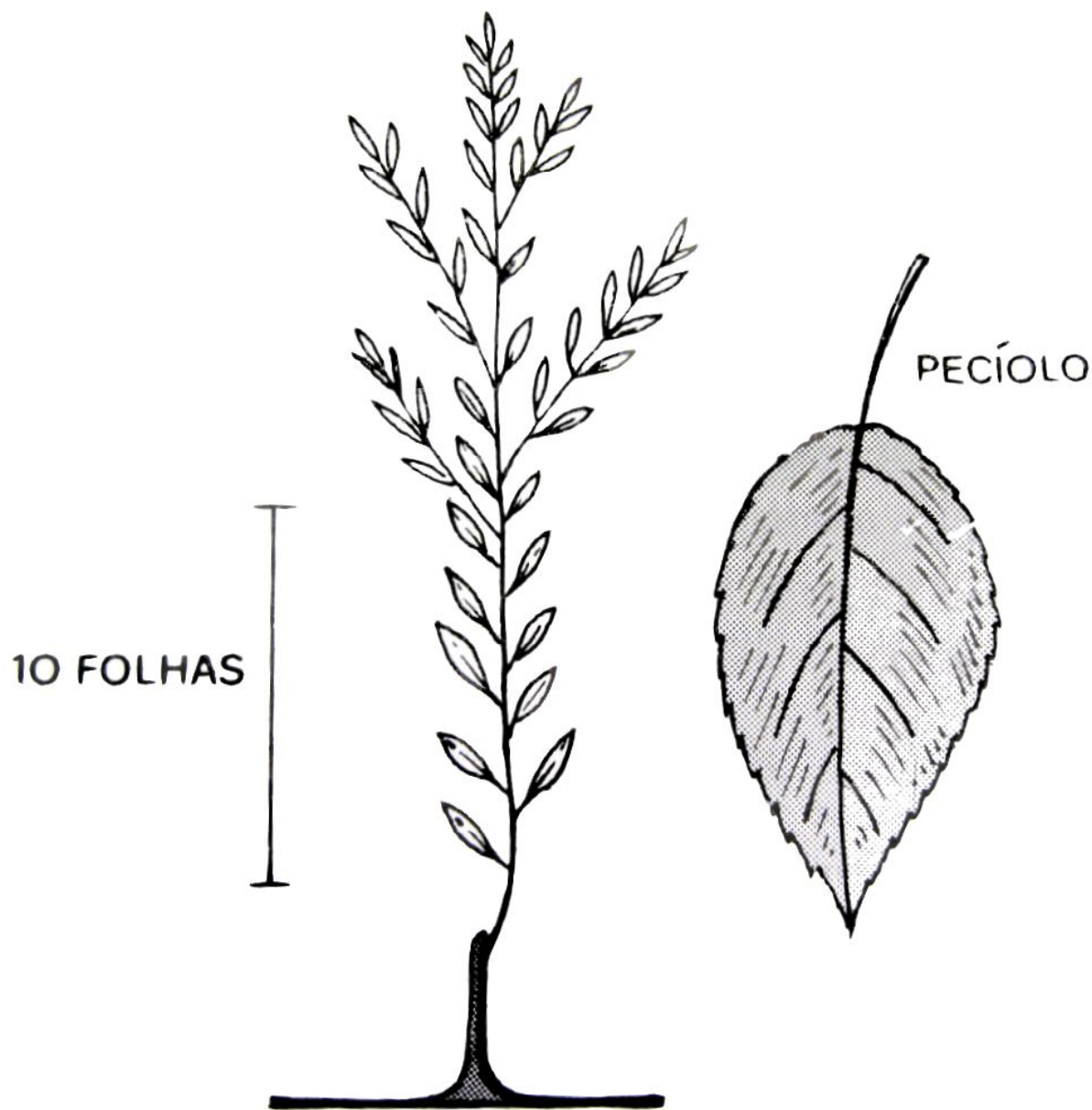


Ilustração: Arthur Henrique Foerstnow

Figura 5: Representação (do local) da muda onde deve ser coletada a amostra para realização do teste de diagnóstico de escaldadura das folhas da ameixeira.

Recomendações gerais

Em ambos os casos (amostragem de folhas ou ramos), é importante não deixar as amostras expostas ao sol, coletá-las antes da aplicação de fungicidas, acaricidas, inseticidas e herbicidas e remetê-las para análise o mais rápido possível. Todo material enviado para análise deve obrigatoriamente ser acompanhado do formulário, em anexo, com todas informações solicitadas.

Interpretação dos resultados

Os resultados estão baseados na avaliação numérica dos testes. A interpretação desse valor numérico obtido é realizada no próprio laboratório, considerando-se como positivas (+) aquelas amostras que se apresentam infectadas pelas bactérias causadoras da escaldadura das folhas da ameixeira, e negativas (-) aquelas que não estão infectadas, ou seja, apresentam-se sadias. É responsabilidade do produtor e/ou técnico coletar as amostras de folhas ou ramos, seguindo cuidadosamente as recomendações aqui descritas, pois a amostragem influi diretamente sobre os resultados da análise.

Custos das análises

Os custos dos testes são periodicamente estabelecidos, e são informados aos interessados antes da realização de análises.

ENDEREÇO PARA REMESSA

Embrapa Clima Temperado

Laboratório de Imunologia e Microscopia Eletrônica

BR398, Km 78, CP 403

96001-970

Pelotas, RS.

Referências

CASTRO, L. A. S. de. Avaliação de “Seedlings” de ameixeira em relação à infecção pela bactéria *Xylella fastidiosa*. **HortiSul**, Pelotas, v. 3, n. 3, p. 05-10, 1995.

CASTRO, L. A. S. de; BARBOSA, W.; NAKASU, B. Y.; RASEIRA, M. do C. B. Ameixa. In: ALBUQUERQUE, A. C. S.; SILVA, A. F. de. (Ed.). **Agricultura tropical**: quatro décadas de inovações tecnológicas, institucionais e políticas. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2008. v. 1, p. 485-491.

CASTRO, L. A. S. de.; DANIELS, J. Situação atual da escaldadura das folhas da ameixeira no Rio Grande do Sul (Brasil). **HortiSul**, Pelotas, v. 3, n. 1, p. 52-56, 1994.

CASTRO, L. A. S. de.; RASEIRA, A.; FORTES, G. R. L.; FINARDI, N. L. Produção de mudas. In: CASTRO, L. A. S. de. (Ed.). **Ameixa**: produção. Pelotas: Embrapa Clima Temperado; Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2003. p. 34-45. (Frutas do Brasil, 43).

CASTRO, L. A. S. de; SILVEIRA, C. A. P. Avanços na produção e certificação de mudas de pessegueiro, nectarineira e ameixeira. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 23, n. 216, p. 57- 63, 2002.

CLARK, M. F.; ADAMS, A. N. Characteristics of microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. **Journal of General Virology**, Cambridge, v. 34, p. 475-483. 1977.

FACHINELLO, J. C. Problemática das mudas de plantas frutíferas de caroço. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE FRUTAS DE CAROÇO, 2000, Porto Alegre. **Anais...** Porto Alegre: UFRGS, 2000. p. 25-40. Editado por Gilmar Arduino Bettio Morodin; Renar João Bender; Paulo Vitor Dutra de Souza.

MADAIL, J. C. M.; BELARMINO, L. C.; NEUTZLING, D. M. **Custo de produção da ameixa, um caso da Serra Gaúcha.** Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2007. 6 p. (Embrapa Clima Temperado. Comunicado Técnico, 157).

NAKA, J. Instrução normativa MAPA nº 20, de 27 de setembro de 2001. In: REUNIÃO PRODUÇÃO DE MUDAS E BORBULHAS, 2002, Brasília, DF. **Anais.** Brasília, DF: Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento, 2002. 1 CD-ROM.

SIMONETTO, P. R.; FIORAVANÇO, J. C.; RASEIRA, M. do C. B.; GRELLMANN, E. O. **Fenologia e características agronômicas de ameixeira (*Prunus salicina* Lindl.) recomendadas para a região serrana do RS.** Porto Alegre: Fepagro; Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2007. 20 p. (Embrapa Clima Temperado. Circular Técnica, 22).

LABORATÓRIO DE IMUNOLOGIA E MICROSCOPIA ELETRÔNICA

FORMULÁRIO PARA REMESSA DE AMOSTRAS

TESTE DE ESCALDADURA DAS FOLHAS DA AMEIXEIRA

Nome do Produtor:

Rua: Nº.....

Bairro:Caixa Postal:

Cidade:Estado: CEP:

Telefone: E-mail:.....

Nome da (s) cultivar (es)		
Idade das plantas		
Nº de plantas no pomar		
Nº de plantas com sintomas		
Nº de plantas mortas		
Data de coleta das amostras		
Última aplicação de inseticida	Data	
	Produto	
Última aplicação de fungicida	Data	
	Produto	
Última aplicação de herbicida	Data	
	Produto	
Últimas adubações realizadas	Datas	
	Adubo (s)	
	Quantidades	

INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES