

## Metodologia para Utilização do Teste Elisa na Diagnose de Murcha Bacteriana em Batata (*solanum tuberosum*)

Luis Antônio Suíta de Castro<sup>1</sup>  
Mery Elizabeth Oliveira Couto<sup>1</sup>

A murcha bacteriana se constitui em um dos maiores problemas da cultura da batata, podendo ocasionar a perda completa da lavoura, principalmente de batata-semente, onde pode ocorrer prejuízo considerável devido a dificuldade de manter extensas áreas livres do patógeno.

Essa enfermidade é causada por uma bactéria denominada *Ralstonia solanacearum* que pode estar presente no solo ou nos tubérculos utilizados como semente. Estes microorganismos invadem a planta e o tubérculo-mãe à partir de ferimentos desenvolvidas em raízes e hastes. De acordo com Hooker (1980) esta bactéria se constitui em um bastonete Gram-negativo, aeróbio, flagelado que não formam cápsula nem endosporo. Estas bactérias estão classificadas em três raças relacionadas ao hospedeiro, a raça 1 corresponde às bactérias que infectam solanaceas e algumas outras plantas, a raça 2 afeta as bananas e helicones, e a raça 3 afeta a batatinha de forma mais específica, havendo, entretanto, áreas de confluências entre as diferentes raças, o que torna sua classificação muito difícil.

O patógeno pode ser disseminado pela água, solo, tratamentos culturais, instrumentos agrícolas, insetos e tubérculos, sendo patogênico a mais de 200 espécies de plantas distribuídas em mais de 33 famílias (Galli, 1980; Akiba *et al*, 2000). Desta forma, o controle da enfermidade torna-se extremamente difícil, principalmente quando as condições do ambiente são favoráveis (+/- 20°C, umidade relativa elevada), sendo que a maioria das medidas de controle devem ser preventivas procurando-se impedir ou retardar o aparecimento do patógeno na cultura.

Em batata, os sintomas observados a campo, correspondem à murcha, redução no crescimento e amarelecimento da folhagem, podendo ocorrer em qualquer estágio do desenvolvimento da planta, sendo que inicialmente apenas um ramo pode apresentar sintomas; posteriormente, todas as folhas podem murchar rapidamente sem que se note uma troca de cor acentuada.

Além dos sintomas, a presença de *R. solanacearum* nas plantas, pode ser determinada pela exudação das bactérias em água (teste do copo), pelo desenvolvimento de colônias em meio de cultura (Kado & Deskett, 1970) ou através do uso de plantas indicadoras (Hooker, 1980; Martin, 1981). Entretanto, atualmente os testes sorológicos tem se destacado, face a sua rapidez e precisão, no diagnóstico de patógenos vegetais e, entre eles, pode ser citada a bactéria *R. solanacearum* (Clark & Adams, 1977; Salazar, 1982; Martin, 1985; Nakashima & Nydegger, 1986).

Os principais métodos imunológicos de diagnose de doenças em plantas correspondem aos testes de microprecipitação, dupla difusão em ágar, látex sensibilizado e ELISA (Torrance & Jones, 1981). De uma forma simplificada, as provas sorológicas envolvem uma reação entre antígeno e anti-corpo, utilizando-se o plasma sanguíneo de um animal e, se constituem em um valioso instrumento de pesquisa, por serem altamente específicos e sensíveis.

<sup>1</sup> Pesquisador(a) da Embrapa Clima Temperado, Rod BR 392, km 78, Cx. Postal 403, Pelotas, RS, CEP 96001-970

Com o objetivo de se ter à disposição uma forma alternativa e precisa de diagnose de *R. solanacearum*, foram realizadas atividades visando a produção de anti-soro e a padronização da metodologia utilizada no teste imunológico ELISA, de forma que permitisse a avaliação precoce de plantas sem sintomas, a avaliação do estado fitossanitário de lavouras de produção de tubérculos-semente e o incremento de trabalhos de laboratório que envolvam o estudo do patógeno.

Na produção do anti-soro para diagnosticar *Ralstonia solanacearum*, foi utilizado um coelho jovem da raça Nova Zelândia. O inóculo foi obtido de plantas que apresentavam infecção natural a nível de campo.

Para padronização do teste imunológico ELISA foi determinado o protocolo para utilização do anticorpo produzido ( $\gamma$ -globulina), conjugado ( $\gamma$ -globulina + enzima fosfatase alcalina), diluição do antígeno (extrato vegetal) e do substrato p-nitrofenol fosfato. Na sensibilização das placas de microtitulação, a gama globulina previamente padronizada a 1,0 mg/ml deve ser diluída na proporção de 1:400 em solução tampão "coating pH 9,6". Os antígenos (amostras) são diluídos a 1:10 quando utilizados extratos de ramas de batata; amostras provenientes de colônias de *Ralstonia solanacearum*, produzidas "in vitro", devem ser inicialmente quantificadas em espectrofotômetro, ajustado em 600 nm para obtenção de 0,250 Absorbância e, posteriormente,

diluídas a 1:10 em tampão PBS acrescentado de TWEEN 20 e PVP 40. O conjugado deve ser diluído 1:200 e o substrato, para-nitrofenol fosfato (Sigma 104), na proporção de 1 mg/ml, dissolvido na solução tampão substrato pH 9,8. As soluções tampão utilizados no processo, são apresentadas na tabela 1.

Em cada etapa do processo, cada orifício da placa recebe 200  $\mu$ l de solução, com períodos de incubação de quatro horas, na ausência de luz com temperatura de 37°C. Entre as etapas do processo, são realizados três períodos de lavagem dos orifícios com solução tampão PBS-TWEEN pH 7,4 utilizando intervalos de três minutos. O tempo de atividade da enzima sobre o substrato deve ser fixado em 30 minutos. As reações podem ser paralisadas com NaOH 3M. Os resultados finais (Figura 1) podem ser avaliados visualmente ou quantificados numericamente a 405 nm em leitora de placa de microtitulação.

Para avaliação do procedimento desenvolvido, foram realizados vários testes para determinação da viabilidade e especificidade do anti-soro. Submeteu-se ao teste, amostras de plantas de batata e tomateiros de várias cultivares, com e sem infecção por *R. solanacearum* e vários isolados de diversas espécies de bactérias e fungos fitopatogênicos. Todos os resultados obtidos mostraram alta confiabilidade no diagnóstico, indicando que a metodologia desenvolvida pode ser utilizada com segurança em testes de rotina, para o diagnóstico de murcha bacteriana causada por *Ralstonia solanacearum*.

**Tabela 1.** Reagentes utilizados no preparo das soluções tampão do teste imunológico ELISA. Embrapa Clima Temperado. Pelotas, RS. 2002.

Reagente	Solução tampão		
	PBS pH 7,4	Coating	Substrato
NaCl	8,0 g	-	-
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,2 g	-	-
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .12H <sub>2</sub> O	2,9 g	-	-
KCL	0,2 g	-	-
NaN <sub>3</sub>	0,2 g	0,2 g	0,2 g
Tween – 20	0,5 ml*	-	-
PVP – 40	2% **	-	-
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	-	1,59 g	-
NaHCO <sub>3</sub>	-	2,93 g	-
Dietanolamina	-	-	97 ml
H <sub>2</sub> O (Destilada)	1000 ml	1000 ml	800 ml

\* Utilizado apenas na solução PBS-TWEEN

\*\* Utilizado na solução PBS-TWEEN + PVP



**Figura 1.** A Uso do método Blotter Test para análise de patologia de sementes, B sintoma de *Fusarium* sp. em espiga de milho. Embrapa Clima Temperado, 2002.

## Referências Bibliográficas

AKIBA, F.; ARAUJO, J.S.P.; RIBEIRO, R.L.D.; SOUZA, J.P.; GUEDES, J.N.; PEREIRA, A.J. Incidência generalizada de murcha bacteriana (*Ralstonia solanacearum*) em lavouras de tomateiro a partir de mudas infectadas na estufa pela água de irrigação. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.26; p.318, 2000. (Suplemento)

CLARK, M.F.; ADAMS, A.M. Characteristics of the enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. **J. General virology**, v.34, p.475-483, 1977.

GALLI, F. **Manual de Fitopatologia, doenças das plantas cultivadas**. São Paulo. Agronômica Ceres, 1980. v.II, 587 p.

HOOKE, W.J. **Compêndio de enfermidade de la papa**. Lima: Centro Internacional de La Papa, 1980. 160p.

KADO, C.I.; DESKETT, M.G. Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* e *Xanthomonas*. **Phytopathology**, St. Paul v.60, p.949-974, 1970.

MARTIN, C. La manchitez bacteriana de la papa *Pseudomonas solanacearum*. Lima: Centro Internacional de La Papa, 1981. 15p. (CIP. Boletim de Información Técnica, 13).

MARTIN, R.R. Recent advances in viruses detection. **Hortscience**, Madison. v.20, n.5, p.837-845, 1985.

NAKASHIMA, J.; NYDEGGER, V. Detecção de *Pseudomonas solanacearum* mediante las técnicas sorológicas de latex y ELISA. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília. v.21, n.1, p.46-50, 1986.

SALAZAR, L. **Manual de enfermidade virosas de la papa**: Lima, Centro Internacional de La Papa, 1982. 111p.

TORRANCE, L.; JONES, R.P.C. Recent development in serological methods suited for use in routine testing for plant viruses. **Plant Pathology**, St. Paul v.30, p.1-24. 1981.

### Comunicado Técnico, 73

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO

**GOVERNO FEDERAL**  
Trabalhando em todo o Brasil

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na:  
**Embrapa Clima Temperado**  
**Endereço:** Caixa Postal 403  
**Fone:** (53) 275 8199  
**Fax:** (53) 275 8219 - 275 8221  
**E-mail:** sac@cpact.embrapa.br

1ª edição

1ª impressão (2002): 20

**Comitê de Publicações** Presidente: Mário Franklin da Cunha Gastal

Secretária-Executiva: Joseane M. Lopes Garcia

**Membros:** Ariano Martins Magalhães Junior, Flávio Luiz Carpena Carvalho, Darcy Bitencourt, Cláudio José da Silva Freire, Vera Allgayer Osório, **Suplentes:** Carlos Alberto Barbosa Medeiros e Eva Choer

**Expediente** Supervisor editorial: Maria Devanir Freitas Rodrigues

Revisão de texto: Maria Devanir Freitas Rodrigues/Ana Luiza Barragana Viegas

Editoração eletrônica: Oscar Castro