

Comunicado 84

Técnico

ISSN 1414.9850
Outubro, 2012

Fotos: Alice Quezado-Duval



Detecção e identificação molecular de *Xanthomonas* spp. causadoras da mancha bacteriana do tomateiro

Alice Maria Quezado-Duval¹
Edivânio Rodrigues de Araújo²
Marisa Álvares da Silva Velloso Ferreira³

Introdução

A mancha bacteriana do tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.) é uma doença de ocorrência mundial que compromete a tomaticultura uma vez que causa redução na produtividade, por provocar redução na área foliar fotossintetizante, queda de flores e frutos em formação e perda do valor comercial dos frutos, além de ser transmitida por sementes infectadas (JONES et al., 1991; QUEZADO-DUVAL; LOPES, 2010). Sabe-se que em condições experimentais de campo, a doença pode causar perdas de até 52% na produção de tomate rasteiro (QUEZADO-SOARES et al., 1998).

Os sintomas da mancha bacteriana são lesões necróticas irregulares na parte aérea da planta. Em ataques severos, as lesões foliares podem coalescer e provocar amarelecimento e morte das folhas, dando um aspecto de queima das plantas, o que também expõe os frutos à escaldadura pelo sol (QUEZADO-DUVAL; LOPES, 2010).

Atualmente, sabe-se que a doença pode ser causada por até quatro espécies do gênero *Xanthomonas*: *X. euvesicatoria*, *X. vesicatoria*, *X. perforans* e *X. gardneri* (JONES et al., 2004). Essas quatro espécies já foram relatadas em lavouras de tomate no Brasil, tanto destinadas ao processamento industrial como para o consumo *in natura* (QUEZADO-DUVAL et al., 2005; PEREIRA et al., 2011). A ocorrência dessas espécies nas lavouras inicialmente deve estar relacionada à sua ocorrência na fonte de inóculo primário da epidemia, como por exemplo, sementes e/ou plantas voluntárias. Já a predominância de uma determinada espécie parece estar associada não apenas a sua aptidão competitiva (HERT et al., 2009), mas também a interações com fatores ambientais (ARAÚJO et al., 2011).

Algumas metodologias para detecção das espécies causadoras da mancha bacteriana, com base na técnica de reação em cadeia da polimerase (polymerase chain reaction - PCR) já foram desenvolvidas (LEITE JÚNIOR et al., 1995; CUPPELS et al., 2006; MORETTI et al., 2009), porém, a não diferenciação de todas as espécies

¹Eng. Agr., D. Sc. Embrapa Hortaliças, Brasília, DF. – alice@cnph.embrapa.br

²Eng. Agr., M. Sc. Embrapa Hortaliças – Universidade de Brasília, Brasília, DF. – edivanio@cnph.embrapa.br

³Eng. Agr., D. Sc. Universidade de Brasília, Brasília, DF. – marisavf@unb.br

ou a necessidade de mais de uma etapa de PCR, limita a eficiência do método e reduz a agilidade na diagnose, respectivamente. Já Koenraad et al. (2009) desenharam iniciadores para os quatro agentes causadores da doença, os quais foram selecionados para este trabalho, haja vista a presença de um complexo de espécies associado à mancha bacteriana no país.

Assim, o estabelecimento de uma metodologia para a rápida e eficiente diagnose da doença e detecção do(s) patógeno(s) envolvido(s) mostra-se necessária, tanto para trabalhos de rotina como de pesquisa relacionados ao patossistema. Neste Comunicado são relatados os procedimentos para a identificação molecular das quatro espécies de *Xanthomonas* associadas à mancha bacteriana do tomateiro, de maneira isolada ou simultânea, utilizando-se iniciadores específicos e as técnicas de PCR e PCR *multiplex*, respectivamente. Tais procedimentos foram validados no Laboratório de Fitopatologia da Embrapa Hortaliças, Brasília, DF, utilizando-se uma gama de isolados brasileiros associados à doença,

em um trabalho específico para esse fim (ARAÚJO et al., 2012).

Tipos de amostra

Os protocolos podem ser aplicados para DNA purificado, suspensão bacteriana ou folhas sintomáticas.

DNA purificado

Para a extração de DNA indica-se a metodologia proposta por Mahuku (2004) com modificações, a qual não utiliza Fenol-Clorofórmio em seu procedimento. Isolados cultivados em meio Ágar-Nutriente (AN) e incubados a 28°C por um período de 3 a 5 dias, devem ser repicados e mantidos sob as mesmas condições de temperatura por mais 48 horas. Após, realiza-se a incubação em meio líquido Caldo-Nutriente (CN) por 16 a 24 horas em temperatura ambiente. Posteriormente a essas etapas, procede-se como ilustrado na Figura 1.

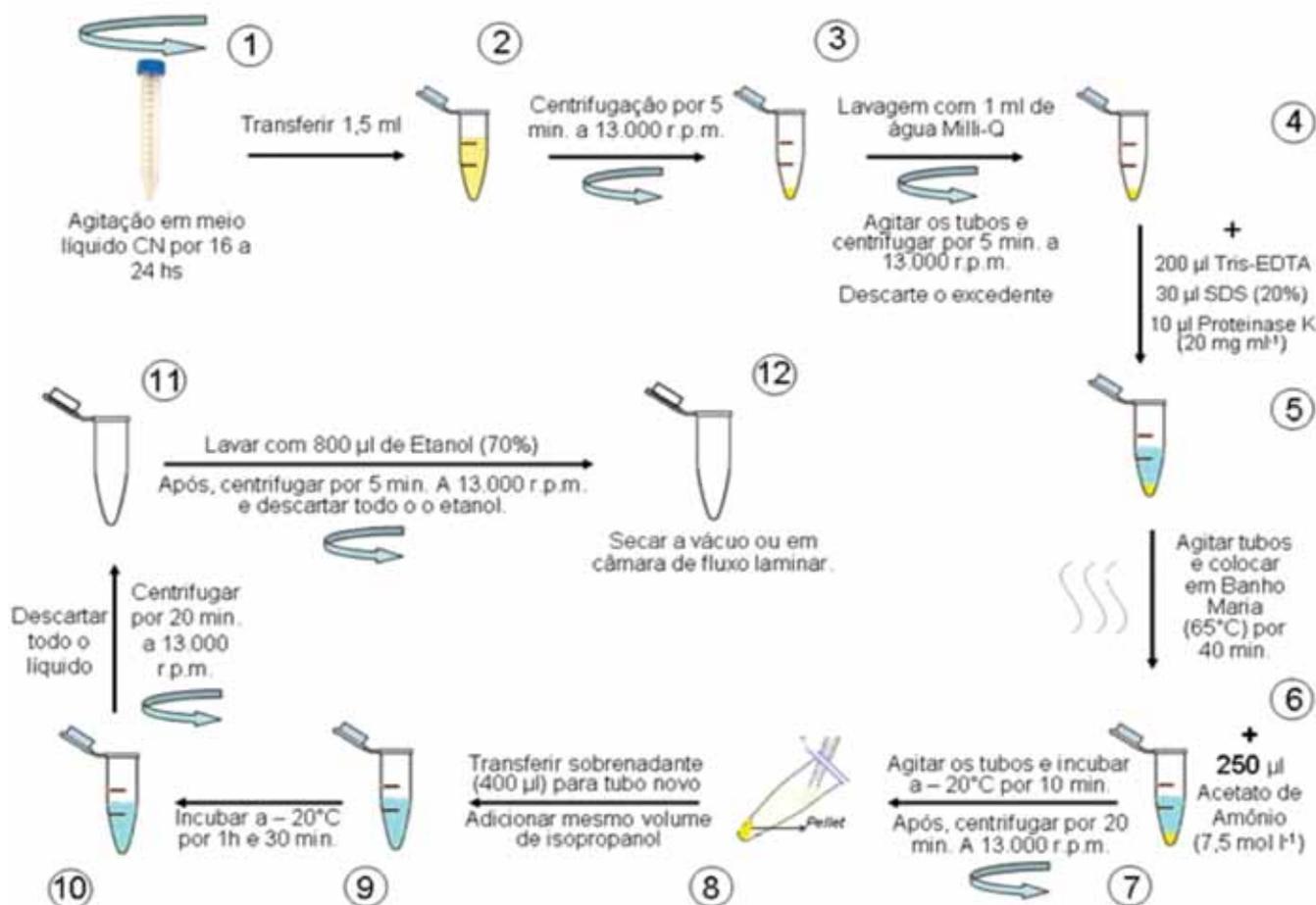


Figura 1. Esquema simplificado de processo de extração de DNA proposto por Mahuku (2004) que pode ser utilizado de forma satisfatória para as quatro espécies de *Xanthomonas* associadas à mancha bacteriana do tomateiro.

Após a etapa 12, adiciona-se 70 μl de Tris-EDTA (10 mmol l^{-1} Tris-HCl pH 8,0; 0,5 mol l^{-1} EDTA) com RNase (1 mg ml^{-1}) e mantém-se o DNA a -20°C até a utilização na PCR.

Suspensão bacteriana

Após crescimento puro da massa bacteriana em meio de cultura AN, procede-se o preparo de suspensão bacteriana em água destilada e autoclavada e ajusta-se a concentração em espectrofotômetro ($\text{OD}_{600} = 0,3$) para aproximadamente 5×10^8 UFC ml^{-1} . Uma forma mais simples de preparo da suspensão, que também funciona bem para este método, é a adição de duas alças de platina de 10 μl (três a quatro colônias) em 200 μl de água estéril, conforme já realizado por Özdemir (2005).

Preparação do extrato de folhas sintomáticas

Folhas sintomáticas devem ser destacadas e lesões individuais maceradas em 200 μl de água destilada autoclavada, como demonstrado na Figura 2. A partir do extrato obtido, retira-se 2 μl para composição da PCR. De forma geral, os extratos brutos das folhas sintomáticas inibem a PCR, dificultando a detecção, logo, é apropriado realizar uma diluição (1:10) para que o método seja eficiente, evitando falsos negativos. Até a diluição de 1:1000 é aceitável para a eficiência deste método.

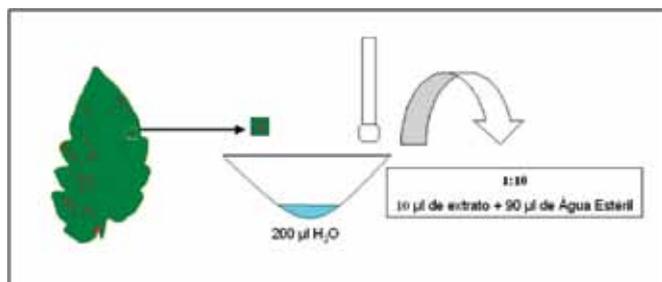


Figura 2. Esquema simplificado do processo de maceração de lesões individuais de folhas de tomate com sintomas de mancha bacteriana do tomateiro.

Iniciadores específicos (“Primers”)

Os iniciadores utilizados foram desenhados por Koenraad et al. (2009), com base em fragmentos de DNA específicos gerados por AFLP, e estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1. Iniciadores específicos para as diferentes espécies de *Xanthomonas* associadas à mancha bacteriana do tomateiro.

Iniciadores	Espécies	Sequência	Fragmento Esperado (pb)
BS-XeF BS-XeR	<i>Xanthomonas euvesicatoria</i>	CATGAAGAAGCTCGGCGTATCG GTCGGACATAGTGGACACATAC	173
BS-XvF BS-XvR	<i>Xanthomonas vesicatoria</i>	CCATGTGCCGTTGAAATACTTG ACAAGAGATGTTGCTATGATTTGC	138
BS-XpF BS-XpR	<i>Xanthomonas perforans</i>	GTCGTGTTGATGGAGCGTTC GTGCGAGTCAATTATCAGAATGTGG	197
BS-XgF BS-XgR	<i>Xanthomonas gardneri</i>	TCAGTGCTTAGTTCCTCATTGTC TGACCGATAAAGACTGCGAAAG	154

Programa da PCR

O programa utilizado para realização da PCR, tanto para a PCR convencional como para a *multiplex*, é de 94°C por 5 minutos, seguido por 30 ciclos de: 94°C por 30 segundos para desnaturação, 66°C por 1 minuto para anelamento e 72°C por 1 minuto para extensão. Por fim, uma extensão final a 72°C por 7 minutos.

Protocolo para PCR convencional

A reação utilizada na PCR convencional deve ser composta de: Tampão 1X; 1,5 mM de MgCl_2 ; 0,2 mmol l^{-1} de cada um dos dNTPs; 2 $\mu\text{mol l}^{-1}$ de cada iniciador; 1,26 U de *Taq* DNA polimerase; aproximadamente 50 ng de DNA; e água Milli-Q® para um volume final de 12 μl .

Os fragmentos amplificados resultantes da PCR convencional devem ser analisados em gel de agarose (1,5%) em tampão TBE 0,5X, por eletroforese conduzida a 100 V durante 2 horas e digitalizados em fotodocumentador sob luz UV (Figura 3 – A, B, C e D).

Protocolo para PCR *multiplex*

Para utilização dos quatro pares de iniciadores e detecção dos diferentes patógenos, utiliza-se o mesmo programa descrito para PCR convencional. As reações são compostas quadruplicando os volumes dos reagentes utilizados na PCR convencional. Com isso, cada reação contém 4,8 μl de Tampão 1X; 1,44 μl de MgCl_2 (1,5 – 1,33 mmol l^{-1}); 3,84 μl do mix de dNTPs (0,2 – 0,18 mmol l^{-1} de cada dNTP); 19,2 μl de um mix contendo os quatro pares de iniciadores (2,0 – 1,77 $\mu\text{mol l}^{-1}$ para todos

os iniciadores); 1 μ l de *Taq* DNA polimerase (1,26 – 1,11 U); 13,72 μ l de água Milli-Q®; e alíquotas de 2 μ l dos diferentes DNA's alvo. A depender da combinação de DNA das diferentes espécies, o volume final da PCR *multiplex* varia entre 46 e 52 μ l.

Os fragmentos amplificados resultantes da PCR convencional são analisados em gel de agarose (3,0%) em tampão TBE 0,5X, por eletroforese conduzida a 100 V durante 3 horas e digitalizados em fotodocumentador sob luz UV (Figura 3 – E).

Dessa forma é possível realizar a detecção e identificação de cada uma das espécies de *Xanthomonas* envolvidas no complexo da mancha

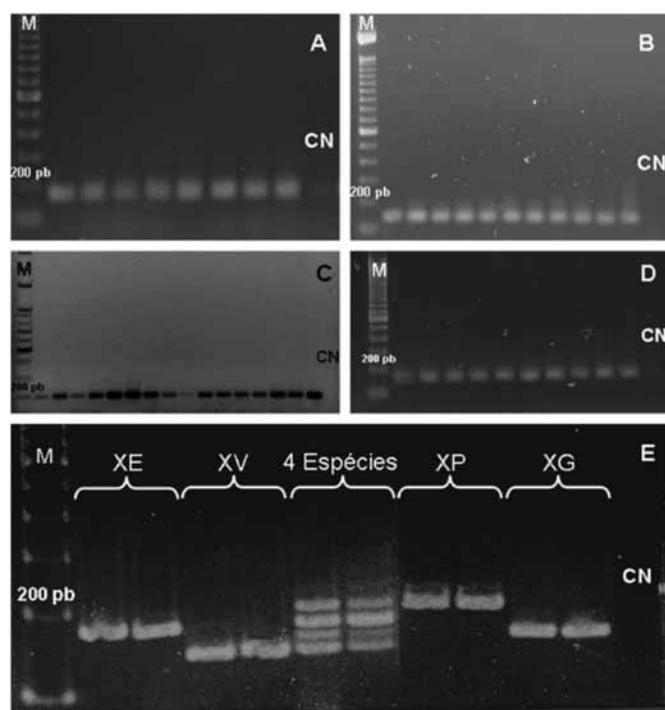


Figura 3. Fragmentos das diferentes espécies de *Xanthomonas* causadoras da mancha bacteriana do tomateiro obtidos com os iniciadores específicos. A – fragmentos de DNA de *X. euvesicatoria* amplificados com os iniciadores Bs-XeF/Bs-XeR. B – fragmentos de DNA de *X. vesicatoria* amplificados com os iniciadores Bs-XvF/Bs-XvR. C – fragmentos de DNA de *X. perforans* amplificados com os iniciadores Bs-XpF/Bs-XpR. D – fragmentos de DNA de *X. gardneri* amplificados com os iniciadores Bs-XgF/Bs-XgR. E – fragmentos amplificados das diferentes espécies por meio de PCR *multiplex*. XE = *Xanthomonas euvesicatoria*; XV = *X. vesicatoria*; XP = *X. perforans*; XG = *X. gardneri* CN – Controle Negativo. M – Marcador Molecular (100 bp DNA Ladder, Invitrogen).

bacteriana do tomateiro utilizando o conjunto de reação e programa da PCR *multiplex*. Isto é, quando se utiliza DNA purificado ou suspensão bacteriana de apenas uma única espécie, a PCR *multiplex*, contendo uma mistura dos quatro pares de iniciadores é capaz de identificar o DNA da espécie presente, aparentemente sem nenhuma competição ou inibição entre os iniciadores.

Da mesma forma, quando da combinação de mais de uma espécie por reação, o método é capaz de detectar cada espécie separadamente num mesmo gel e em uma única etapa. Em todas as combinações possíveis, fragmentos esperados são amplificados para os diferentes casos, ou seja, obtém-se de um a quatro fragmentos em gel de agarose (3,0%) a depender da combinação de espécies utilizada (Figura 3 – E).

Uma técnica que seja capaz de identificar o patógeno diretamente de uma lesão e conseqüentemente, diagnostica a doença, como o apresentado agiliza o processo diagnóstico e pode servir como ferramenta adicional de fiscalização para órgãos quarentenários.

Referências

- ARAÚJO, E. R.; COSTA, J. R.; FERREIRA, M. A. S. V.; QUEZADO-DUVAL, A. M. Simultaneous detection and identification of the *Xanthomonas* species complex associated with tomato bacterial spot using species-specific primers and multiplex PCR. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, 2012. Doi: 10.1111/j.1365-2672.2012.05431.x
- ARAÚJO, E. R.; PEREIRA, R. C.; FERREIRA, M. A. S. V.; CAFÉ-FILHO, A. C.; MOITA, A. W.; QUEZADO-DUVAL, A. M. Effect of temperature on pathogenicity components of tomato bacterial spot and competition between *Xanthomonas perforans* and *X. gardneri*. **Acta Horticulturae**, The Hague, v. 914, p. 39-42, 2011.
- CUPPELS, D. A.; LOUWS, F. J.; AINSWORTH, T. Development and evaluation of PCR based diagnostic assays for the bacterial speck and bacterial spot pathogens of tomato. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 90, p. 451-458, 2006.
- HERT, A. P.; MARUTANI, M.; MOMOL, M. T.; ROBERTS, P. D.; JONES, J. B. Analysis of

pathogenicity mutants of a bacteriocin producing *Xanthomonas perforans*. **Biological Control**, Orlando, v. 51, p. 362-369, 2009.

JONES, J. B.; JONES, J. P.; STALL, R. E.; ZITTER, T. A. **Compendium of tomato diseases**. Saint Paul: APS Press, 1991. 73 p.

JONES, J. B.; LACY, G. H.; BOUZAR, H.; STALL, R. E.; SCHAAD, N. W. Reclassification of the xanthomonads associated with bacterial spot disease of tomato and pepper. **Systematic and Applied Microbiology**, Stuttgart, v. 27, p. 755-762, 2004.

KOENRAADT, H.; BETTERAY, B. van; GERMAIN, R.; HIDDINK, G.; JONES, J. B.; OOSTERHOF, J. Development of specific primers for the molecular detection of bacterial spot of pepper and tomato. **Acta Horticulturae**, The Hague, v. 808, p. 99-102, 2009.

LEITE JÚNIOR, R. P.; JONES, J. B.; SOMODI, G. C.; MONSAVAGE, G. V.; STALL, R. E. Detection of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* associated with pepper and tomato seed by DNA amplification. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 79, p. 917-922, 1995.

MAHUKU, G. S. A simple extraction method suitable for PCR-based analysis of plant, fungal, and bacterial DNA. **Plant Molecular Biology Reporter**, Athens, v. 22, p. 71-81, 2004.

MORETTI, C.; AMATULLI, M. T.; BUONAURO, R. PCR-based assay for the detection of *Xanthomonas euvesicatoria* causing pepper and tomato bacterial spot. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 49, p. 466-471, 2009.

ÖZDEMİR, Z. Development of a multiplex PCR assay for concurrent detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* and *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria*. **Plant Pathology Journal**, Weinheim, v. 4, p. 133-137, 2005.

PEREIRA, R. C.; ARAÚJO, E. R.; FERREIRA, M. A. S. V.; QUEZADO-DUVAL A. M. Occurrence of *Xanthomonas* species causing bacterial spot in fresh market tomato fields in Brazil. **Acta Horticulturae**, The Hague, v. 914, p. 61-64, 2011.

QUEZADO-DUVAL, A. M.; LOPES, C. A. **Mancha bacteriana: uma atualização para o sistema de produção integrada de tomate indústria**. Brasília, DF: Embrapa Hortaliças 2010. 28 p. (Embrapa Hortaliças. Circular Técnica, 84).

QUEZADO-DUVAL, A. M.; LOPES, C. A.; LEITE JUNIOR, R. P.; LIMA, M. F.; CAMARGO, L. E. A. Diversity of *Xanthomonas* spp. associated with bacterial spot of processing tomatoes in Brazil. **Acta Horticulturae**, The Hague, v. 695, p. 101-108, 2005.

QUEZADO-SOARES A. M.; SILVA, V. L.; GIORDANO, L. B.; LOPES, C. A. Redução na produtividade de tomateiro para processamento industrial devido à mancha bacteriana. **Horticultura Brasileira**, Brasília, DF, v. 16, p. 266, 1999. Resumo.

Comunicado Técnico, 84

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na Embrapa Hortaliças
Rodovia BR-060, trecho Brasília-Anápolis, km 9
C. Postal 218, CEP 70.351.970 – Brasília-DF
Fone: (61) 3385.9000
Fax: (61) 3556.5744
E-mail: sac@cnph.embrapa.br
1ª edição
1ª impressão (2009): 1.000 exemplares
2ª impressão (2012): 2.000 exemplares

Comitê de Publicações

Presidente: Warley Marcos Nascimento
Editor Técnico: Fábio Akyoshi Suinaga
Supervisor Editorial: George James
Secretária: Gislaíne Costa Neves
Membros: Aginaldo Donizete Ferreira de Carvalho, Ítalo Morais Rocha Guedes, Jadir Borges Pinheiro, José Lindorico de Mendonça, Mariane Carvalho Vidal, Neide Botrel, Rita de Fátima Alves Luengo

Expediente

Normalização bibliográfica: Antonia Veras
Editoração eletrônica: André L. Garcia