

IMUNOMARCAÇÃO DE *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* COM OURO UTILIZANDO ANTICORPOS POLICLONAIS

JOÃO S. DE PAULA ARAUJO¹; BRUNO C. DE OLIVEIRA^{1,2}; FÁBIO LOPES OLIVARES³; FÁBIO B. DOS REIS JUNIOR⁴; GERALDO BAETA CRUZ⁵; CHARLES F. ROBBS¹; RAUL DE L. DUARTE RIBEIRO¹

1. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRuralRJ), Instituto de Agronomia, Dep. de Fitotecnia, Rod. BR 465, Km 7, Seropédica, Rio de Janeiro, 23890-000. E-mail:araujoft@ufrj.br. 2. Graduando de Agronomia da UFRuralRJ, Bolsista do PIC. 3. Universidade Estadual do Norte Fluminense, Laboratório de Biologia Celular e Tecidual – CBB. 4. Embrapa Cerrados, Laboratório de Microbiologia do Solo. 5. Embrapa Agrobiologia.

RESUMO

O bjetivou-se investigar a colonização de tecidos de videira por *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* através de microscopia ótica e eletrônica de transmissão. Seções de folhas e ramos foram submetidas a imunomarcação com ouro associada a anticorpos policlonais específicos. A imunomarcação confirmou a presença da bactéria mesmo em amostras coletadas de videiras assintomáticas, credenciando os anticorpos produzidos para o diagnóstico da doença e para uso em programas de certificação de material propagativo.

Palavras-chave: *Vitis vinifera*, cancro bacteriano, imunodeteção.

ABSTRACT

IMMUNOGOLD LABELING OF *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* WITH POLYCLONAL ANTIBODIES

Grapevine tissue colonization by *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* was investigated through light microscopy and transmission electron microscopy. Leaf and branch sections were prepared and immunogold labelled using specific polyclonal antibodies. The presence of bacteria was detected even in samples from symptomless grapevines. Results indicated that polyclonal antibodies may be useful for diagnostic purpose and for certification of propagative stocks.

Key words: *Vitis vinifera*, bacterial canker, immunodetection, electron microscopy.

INTRODUÇÃO

Passados cerca de sete anos dos primeiros registros no Brasil (Malavolta Jr. *et al.*, 1998; Araujo *et al.*, 1999) o cancro bacteriano da videira (*Vitis vinifera* L.), causado por *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* (Nayudu) Dye, constitui-se numa das mais importantes doenças do perímetro irrigado do Submédio do Vale do Rio São Francisco. Nas folhas, os sintomas manifestam-se sob a forma de pequenas lesões necróticas, angulares e de coloração castanha, que conduzem ao crestamento do limbo foliar. Necroses de igual natureza são também observadas em ramos, gavinhas, engaços dos cachos e bagas. É nos ramos, contudo, que os sintomas são mais severos e prejudiciais, representados pela obstrução dos tecidos vasculares e pela formação de cancrios extensos e

profundos. Esses cancrios resultam na dilaceração de tecidos e restrição do fluxo de seiva, acarretando murcha e secamento dos ramos (Araujo & Robbs, 2000). A bacteriose tem provocado prejuízos em plantios dos cultivares Red Globe, Itália, Rubi, Benitaka, Festival, Piratininga, Catalunha, Christmas Rose, Perlette e Superior naquela região (Araujo *et al.*, 2004). A sobrevivência do patógeno tem lugar em ramos de videira, nos cancrios já formados ou associada a infecções latentes e assintomáticas, o que evidencia a potencial importância dos órgãos vegetativos da videira na disseminação do cancro bacteriano (Araujo, 2001; Nascimento & Mariano, 2004).

Considerando não se dispor ainda de terapias eficazes para controle da bacteriose, torna-se imprescindível à busca de tecnologias direcionadas à produção e distribuição de material propagativo

garantidamente isento de infecção. Para isto, métodos imunológicos e de biologia molecular vêm sendo desenvolvidos para emprego na detecção de *X. campestris* pv. *viticola* em matrizes de videira (Araujo, 2001; Trindade & Ferreira, 2001). Viabilizadas essas técnicas, viveiros de mudas poderão ser inspecionados e credenciados a partir de exames periódicos de cunho fitossanitário.

No intuito de contribuir para esse objetivo, investigou-se a colonização de tecidos de videira por *X. campestris* pv. *viticola* através de imunomarcção com ouro, usando anticorpos policlonais produzidos especificamente contra a bactéria (Araujo *et al.*, 2005).

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras de folhas e ramos de videira (cv. Red Globe), com sintomas do cancro ou assintomáticas, coletadas na Região do Semi-Árido do Vale do Rio São Francisco, foram levadas ao Setor de Microscopia do Laboratório de Biologia Celular e Tecidual da Universidade Estadual do Norte Fluminense (UENF/RJ) e seccionadas em peças de 0,5 a 1,0 cm de comprimento por 0,1 a 0,5 cm. Essas seções foram lavadas duas vezes em solução tampão fosfato (50 mM, pH 6,8) e fixadas em solução de glutaraldeído (2,5%) em tampão fosfato, por 24h a temperatura ambiente. Em seguida, amostras foram preparadas para microscopia ótica e para microscopia eletrônica de transmissão, de acordo com James *et al.* (1994), e incubadas com os anticorpos policlonais AC4558 e AC4560 (Araujo, 2001; Araujo *et al.*, 2005), conforme os procedimentos a seguir descritos:

Imunomarcção com partículas de ouro para microscopia ótica: seções semi-finas (0,7-1 µm), fixadas, desidratadas e emblocadas, foram obtidas em ultramicrotomo, e colocadas em gota d'água sobre lâminas de microscópio, cobertas com solução aquosa de gelatina (1%), sendo submetidas a temperaturas em torno de 40°C. As lâminas contendo os cortes foram então colocadas em câmara úmida, sendo cobertas com solução de bloqueio IGL (soro albumina bovina BSA diluído em PBS 1%) por 1h a temperatura ambiente. Em seguida, após rápida lavagem em água destilada/esterilizada, foram aplicados os anticorpos AC4558 ou AC4560, diluídos a 1:500, sendo o material incubado em câmara úmida por 1h a 25°C. Utilizando boxes de vidro, as seções foram tratadas em solução de lavagem (1% Tween 20 em PBS) e água destilada/esterilizada (5 minutos em cada) e secas com papel absorvente. Em seqüência, foram aplicados 40-50 µl de anticorpo secundário (imunoglobulinas IgG de cabra, produzidas contra imunoglobulinas de coelho) conjugado com partículas de ouro de 15 nm de diâmetro, diluídas a 1:100 em solução IGL, permanecendo em câmara úmida por 4h a temperaturas variando de 20 a 25°C. Decorrido

esse período, as lâminas foram novamente lavadas em solução de lavagem e em água destilada/esterilizada por mais 5 minutos e postas para secar, encerrando o processo de imunomarcção. Para visualização ao microscópio ótico, marcaram-se as partículas de ouro com prata, utilizando o "kit" Intense SE BL Silver Enhancement (Laboratory Janssen Life Sciences Products), de acordo com o método descrito por VanderBosh *et al.* (1986). A reação foi caracterizada por um precipitado negro ao redor das partículas de ouro conjugadas ao anticorpo secundário.

Imunomarcção com partículas de ouro para exame ao microscópio eletrônico de transmissão: seções ultrafinas (70-80 nm) dos tecidos, pré-selecionados sob microscopia ótica, foram recolhidas em grades hexagonais de níquel (300 mesh), cobertas com filme de formvar e postas a secar em placas de Petri, sobre papel de filtro, para imunomarcção com ouro (Vanderbosch, 1986). A etapa inicial, para bloqueio das reações inespecíficas, consistiu em fazer flutuar a grade, com a face contendo o corte histológico voltada para a superfície de uma gota (50 µl) de solução IGL (soro albumina bovina BSA, diluído em PBS 1%) pelo período de 1h. Em seguida, as grades foram incubadas a 25 °C em gotas (50 µl) de anticorpos primários (AC4558, AC4560) diluídos a 1:500 em tampão PBS, permanecendo em câmara úmida de 1 a 2h e posteriormente lavadas, cuidadosamente, por 30 seg em água destilada/esterilizada. Após essa lavagem, as grades foram imersas em gota (40-50 µl) de anticorpo secundário, diluído a 1:100 em solução IGL, por mais 2h, a temperatura de 25 °C. Ao fim desse roteiro, as grades foram lavadas em água destilada/esterilizada, com auxílio de uma pisseta, e totalmente imersas em gota de IGL. Repetido esse procedimento, por três vezes, dentro de um período de 5 minutos, as grades foram postas a secar sobre papel de filtro e contrastadas com acetato de uranila (5%) por 10 minutos e citrato de chumbo (0,2%) por 2 minutos, achando-se prontas para observação ao microscópio eletrônico de transmissão. A reação foi visualizada pela deposição de pontos negros (partículas de ouro de 15 nm) em regiões da seção que expuseram os determinantes antigênicos para os quais os soros foram produzidos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Tecidos de ramos e folhas de videira com sintomas do cancro bacteriano e também originados de amostras assintomáticas, provenientes de áreas de produção afetadas pela doença, revelaram intensa colonização por *X. campestris* pv. *viticola*. Tecidos internos de folhas, ramos e pecíolos lesionados, mostravam perda de integridade celular, associada à presença de matriz polissacarídica. Massas densas, constituídas de células bacterianas, foram detectadas através da

imunomarcção com partículas de ouro associadas aos anticorpos AC4558 e AC4560, mediante precipitação com prata. Essas bactérias, presentes no parênquima xilemático e vasos condutores foram, assim, identificados como *X. campestris* pv. *viticola* (Figura 1). Em estádios avançados da doença, acentuada maceração celular foi verificada, com colônias bacterianas distribuídas aleatoriamente nas regiões degeneradas. Imunomarcção aplicada nesses tecidos

revelou invariável presença de *X. campestris* pv. *viticola* em meio a uma matriz fibrilar, constituindo halo eletrotransparente ao redor das células bacterianas e indicando seu envolvimento na desfibrilação da parede celular do hospedeiro (Figura 2). Acredita-se que, devido a essa degeneração, ocorra congestionamento de água nos tecidos infectados e conseqüente exsudação da bactéria.

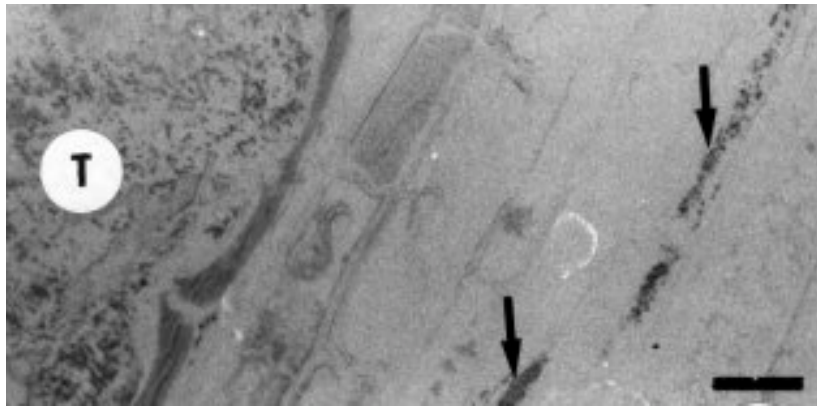


Figura 1- Fotomicrografia ótica de contraste interferencial e diferencial de seção longitudinal de pecíolo de videira. Amostras foram incubadas com anticorpos policlonais (AC4558/AC4560) produzidos contra *X. campestris* pv. *viticola*, imunomarcadas com partículas de ouro e submetidas à revelação do sinal com prata (IGL,SE). Notar presença de células da bactéria em região de tecido macerado (T) e confinadas no xilema (•). bar = 5µm.

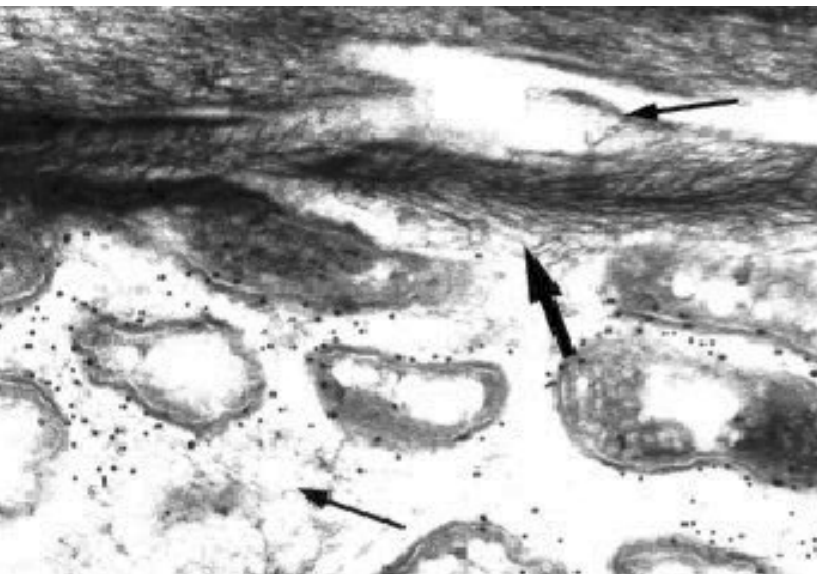


Figura 2 - Fotomicrografia eletrônica de transmissão de tecidos de videira imunomarcados (IGL) com partículas de ouro ($\text{Ø} = 15\text{nm}$) associadas a anticorpos policlonais específicos (AC4558/AC4560). Notar extensa desfibrilação da parede celular (\rightarrow) em presença de células de *X. campestris* pv. *viticola* (•).

As imagens revelaram, ainda, o progresso da invasão dos tecidos da videira pela bactéria, a qual após multiplicar-se nos espaços intercelulares, alcança o parênquima e, a partir daí, os feixes vasculares do

xilema e do floema adjacentes (Figura 1). Nessa seqüência, haveria colonização sistêmica da videira por *X. campestris* pv. *viticola*, responsável pelas descolorações dos tecidos internos de ramos, de

nervuras foliares e engaços, de onde constantemente se verifica intensa exsudação bacteriana.

Fotomicrografias eletrônicas de transmissão onde aparecem colônias de *X. campestris* pv. *viticola* imunomarcadas *in situ* com partículas de ouro associadas a anticorpos policlonais específicos (AC4558/AC4560), evidenciaram prevalência de epítomos na superfície da parede celular bacteriana, bem como a não reação dos anticorpos com fibrilas (Figura 3).

As fotomicrografias obtidas de videira permitiram confirmar que *X. campestris* pv. *viticola* reside sobre folhas de videira, com ou sem sintomas do cancro bacteriano, em áreas de produção de uva do Submédio São Francisco. Essas populações epífitas provavelmente constituem importante reservatório de

inóculo, inclusive nos períodos do ano desfavoráveis à ocorrência de novas infecções.

Anticorpos policlonais, tais como AC-4558 e AC-4560, mostraram potencial para representar uma poderosa ferramenta na identificação da bactéria associada aos tecidos da videira. Estudos já revelaram especificidade em nível de patovar (Araujo *et al.*, 2005), destacando a eficiência da imunomarcção para detectar *X. campestris* pv. *viticola* em elementos de propagação vegetativa. Por conseguinte, essa técnica poderá subsidiar programas de certificação, com o objetivo de restringir a disseminação do agente do cancro bacteriano da videira, principalmente para regiões do território nacional ainda livres da incidência da doença.

Figura 3 - Fotomicrografia eletrônica de transmissão de células de *X. campestris* pv. *viticola* imunomarcadas (IGL) com partículas de ouro ($\varnothing = 15\text{nm}$) associadas a anticorpos policlonais específicos (AC4558/AC4560). Notar prevalência de epítomos (\bullet) na superfície da parede celular bacteriana e a não reação dos anticorpos com fibrilas. bar = $0,15\mu\text{m}$.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao CNPq/Projeto Universal (processo 478549/2003-2, APQ), pelo apoio ao desenvolvimento da pesquisa e bolsa concedida.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARAÚJO, J. S. de P.; ROBBES, C. F.; MACIEL, G. F. Cancro

da videira no Vale do Rio São Francisco. Brasil. *Summa Phytopathologica*, Jaboticabal, v. 25, n. 1, p. 83, 1999.

ARAÚJO, J. S. de P.; ROBBES, C. F. Sintomatologia, patogenicidade e controle do cancro bacteriano da videira (*Xanthomonas campestris* pv. *viticola*) no Brasil. *Agronomia*, Seropédica, v. 34, n. 1, p. 83-86, 2000.

ARAÚJO, J. S. de P. *Perfil Epidemiológico e Subsídios*

- para o Controle de Xanthomonas campestris pv. viticola (Nayudu) Dye, Agente do Cancro Bacteriano da Videira (Vitis vinifera L.) no Brasil.* Seropédica, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 2001, 125p. Tese de Doutorado.
- ARAÚJO, J. S. de P.; ROBBS, C. F.; RIBEIRO, R. de L. D. Manejo Integrado de Fitobacterioses de Importância Econômica no Brasil. Parte 2. Revisão Anual de Patologia de Plantas (RAPP), Passo Fundo, v. 12, p. 147-200, 2004.
- ARAÚJO, J. S. de P.; REIS JUNIOR, F. B.; NEVES, G. B.; OLIVEIRA, B. C.; ROBBS, C. F.; RIBEIRO, R. de L. D.; POLIDORO, J. C. Produção e caracterização de diferentes anticorpos policlonais produzidos contra *Xanthomonas campestris pv. viticola*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v. 40, n. 3, p. 305-309, 2005.
- JAMES, E. K.; REIS, V. M.; OLIVARES, F. L.; BALDANI, J. I.; DOBEREINER, J. Infection of sugar cane by the nitrogen-fixing bacterium *Acetobacter diazotrophicus*. *Journal of Experimental Botany*, v. 45, p. 757-766, 1994.
- MALAVOLTA JR., V. A.; ALMEIDA, I. M. G.; SUGIMORI, M. H.; RIBEIRO, I. J. A.; RODRIGUES NETO, J.; PIRES, E. J. P.; NOGUEIRA, E. M. C. Ocorrência de *Xanthomonas campestris pv. viticola* em videira no Brasil. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v. 23 (supl.), p. 211, 1998.
- NASCIMENTO, A. R. P.; MARIANO, R. L. R. Cancro bacteriano da videira: etiologia, epidemiologia e medidas de controle. *Ciência Rural*, v. 34, p. 301-307, 2004.
- TRINDADE, L. C.; FERREIRA, M. A. S. V. 2001. Caracterização de *Xanthomonas campestris pv. viticola* através de REP-PCR. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v. 26 (supl.), p.285 (resumo).
- VANDERBOSH, K. A. Light and electron microscopic visualization of uricase by immunogold labelling of sections of resin-embedded soybean. *Journal of Microscopy*, v. 143, p. 187-197, 1986.