

II

(Actos cuja publicação não é uma condição da sua aplicabilidade)

COMISSÃO

DECISÃO DA COMISSÃO

de 9 de Setembro de 1997

que descreve um regime temporário de testes para diagnóstico, detecção e identificação de *Pseudomonas solanacearum* (Smith) Smith na batata

(97/647/CE)

A COMISSÃO DAS COMUNIDADES EUROPEIAS,

Tendo em conta o Tratado que institui a Comunidade Europeia,

Tendo em conta a Directiva 77/93/CEE do Conselho, de 21 de Dezembro de 1976, relativa a medidas de protecção contra a introdução na Comunidade de organismos prejudiciais às plantas e produtos vegetais e contra a sua propagação no interior da Comunidade⁽¹⁾, com a última redacção que lhe foi dada pela Directiva 97/14/CE⁽²⁾, e, nomeadamente, o n.º 3 do seu artigo 15.º,

Considerando que, nos termos da Decisão 95/506/CE da Comissão, de 24 de Novembro de 1995, que autoriza os Estados-membros a adoptar provisoriamente medidas adicionais contra a propagação de *Pseudomonas solanacearum* (Smith) Smith proveniente do Reino dos Países Baixos⁽³⁾, alterada pela Decisão 96/599/CE⁽⁴⁾, e, nomeadamente, o n.º 2, alínea a) bb), do seu artigo 1.º, os

Estados-membros devem, quando procedam a testes oficiais ou controlados oficialmente, aplicar o processo de quarentena n.º 26 relativo a *Pseudomonas solanacearum* (Smith) Smith, conforme estabelecido pela Organização Europeia para a Protecção das Plantas (OEPP)⁽⁵⁾ ou qualquer outro processo aprovado de acordo com o procedimento previsto no artigo 16.ºA da Directiva 77/93/CEE;

Considerando que o Comité *ad hoc* de Peritos em Doenças Bacterianas das Plantas, estabelecido pelos serviços da Comissão das Comunidades Europeias sob os auspícios do Comité Fitossanitário Permanente, definiu um regime temporário de testes que tem em conta os procedimentos aperfeiçoados de detecção e realização de testes desenvolvidos desde a publicação do processo de quarentena n.º 26 da OEPP; que esse regime de testes é temporário, dado que se espera a continuação da investigação relativa nomeadamente à sensibilidade e especificidade dos diferentes testes, com o objectivo de seleccionar e normalizar os testes optimizados a incluir num método de teste actualizado;

Considerando que o regime temporário de testes previsto na presente decisão está em conformidade com o parecer do Comité Fitossanitário Permanente,

⁽¹⁾ JO L 26 de 31. 1. 1977, p. 20.

⁽²⁾ JO L 87 de 2. 4. 1997, p. 17.

⁽³⁾ JO L 291 de 6. 12. 1995, p. 48.

⁽⁴⁾ JO L 265 de 18. 10. 1996, p. 18.

⁽⁵⁾ Boletim EPPO/OEPP 20, 255-262 (1990).

ADOPTOU A PRESENTE DECISÃO:

Artigo 1.º

Para efeitos da aplicação do disposto no n.º 2, alínea a) bb), do artigo 1.º da Decisão 95/506/CE, o processo de quarentena n.º 26 para a *Pseudomonas solanacearum* (Smith) Smith, conforme estabelecido pela Organização Europeia para a Protecção das Plantas (OEPP), é substituído pelo regime temporário de testes para o diagnóstico, detecção e identificação de *Pseudomonas solanacearum* (Smith) Smith definido no anexo da presente decisão.

Artigo 2.º

Os Estados-membros são os destinatários da presente decisão.

Feito em Bruxelas, em 9 de Setembro de 1997.

Pela Comissão
Franz FISCHLER
Membro da Comissão

ANEXO

**ESQUEMA DE ENSAIO PROVISÓRIO PARA O DIAGNÓSTICO, DETECÇÃO E IDENTIFICAÇÃO
DE *PSEUDOMONAS SOLANACEARUM* (SMITH) SMITH**

CONTEÚDO DO ESQUEMA DE ENSAIO

O esquema de ensaio apresentado descreve os vários procedimentos envolvidos:

- i) no diagnóstico do mal murcho em plantas e tubérculos de batateira,
- ii) na detecção de *Pseudomonas solanacearum* em amostras de tubérculos de batateira,
- iii) na identificação de *Pseudomonas solanacearum*.

Nos apêndices, são fornecidos pormenores para a preparação dos materiais a utilizar nos testes, isto é, meios de cultura, soluções tampão, outras soluções e reagentes.

ÍNDICE

Secção I.	Aplicação do esquema de ensaio	4
	1. Diagnóstico do mal murcho em plantas e tubérculos de batateira	4
	2. Detecção e identificação de <i>Pseudomonas solanacearum</i> em amostras de tubérculos de batateira	6
Secção II.	Diagnóstico do mal murcho em plantas e tubérculos de batateira	8
	1. Sintomas do mal murcho da batateira	8
	2. Teste(s) para rastreio	8
	3. Isolamento	9
	4. Teste(s) para confirmação	9
Secção III.	Detecção e identificação de <i>Pseudomonas solanacearum</i> em amostras de tubérculos de batateira	12
	1. Preparação da amostra para o teste	12
	2. Teste de imunofluorescência (IF)	13
	3. «Enzyme linked immunosorbent assay» (ELISA)	15
	4. Teste de reacção em cadeia da polimerase (PCR™)	15
	5. Teste de sementeira em placas com meio selectivo	17
	6. Bio-ensaio	18
	7. Testes de enriquecimento	18
	8. Testes de patogenicidade	18
Apêndice 1.	Meios nutritivos para isolamento e cultura de <i>Pseudomonas solanacearum</i>	19
Apêndice 2	Materiais para a preparação das amostras	20
Apêndice 3	Materiais para o teste IF	21
Apêndice 4	Determinação do nível de contaminação no teste IF	22
Apêndice 5	Materiais para o teste ELISA	23
Apêndice 6	Materiais para o teste PCR	24
Apêndice 7	Materiais para o teste de sementeira em placas com meio selectivo	24
Bibliografia	25

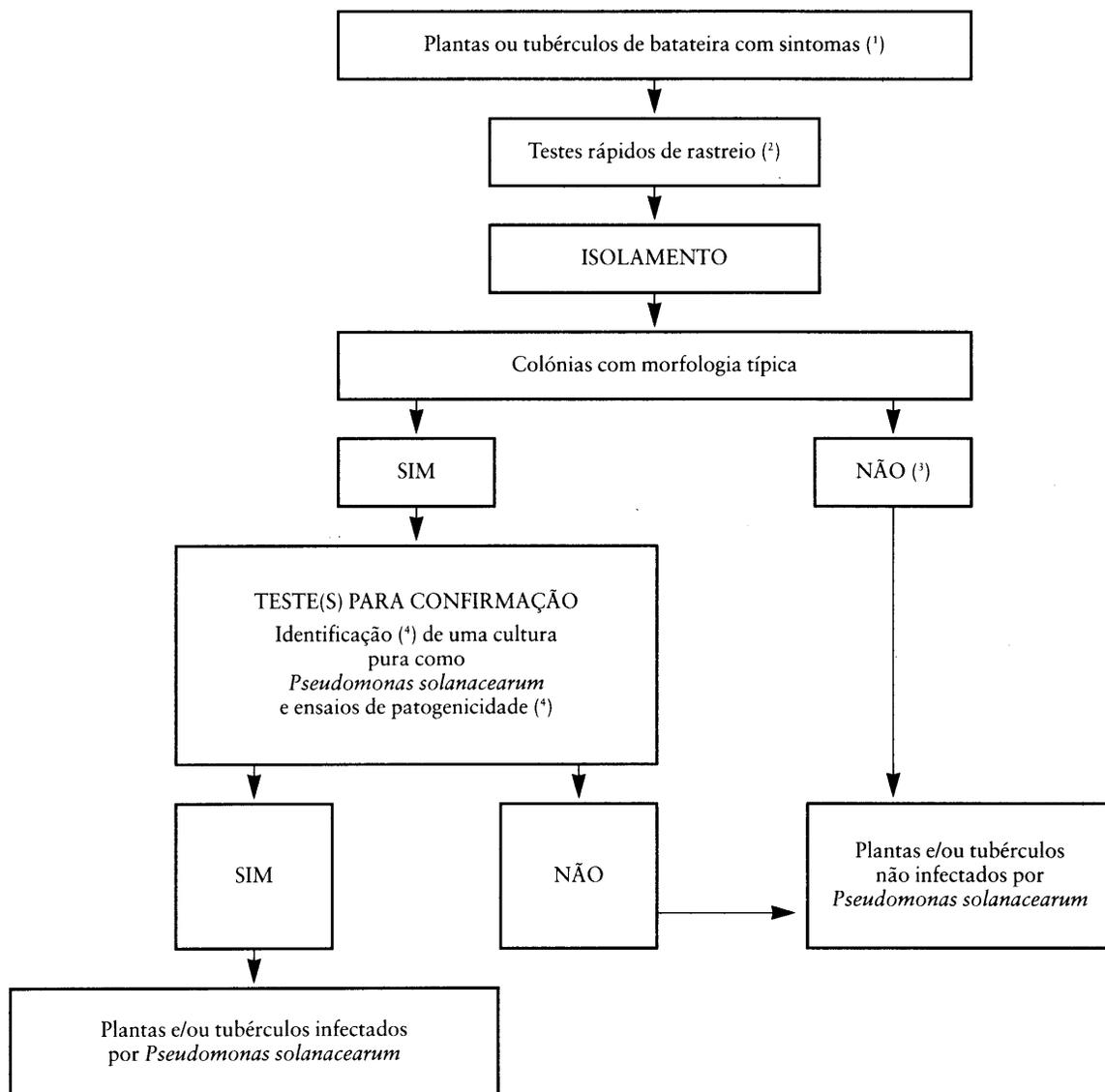
SECÇÃO I

APLICAÇÃO DO ESQUEMA DE ENSAIO

1. Diagnóstico do mal murcho em plantas e tubérculos de batateira

Este procedimento destina-se a plantas e tubérculos com sintomas típicos ou suspeitos de mal murcho da batateira. Implica um teste rápido de rastreio, isolamento do patógeno do tecido vascular infectado em meios de cultura adequados e, em caso de resultado positivo, identificação da cultura como *Pseudomonas solanacearum*.

Apresentação do fluxograma



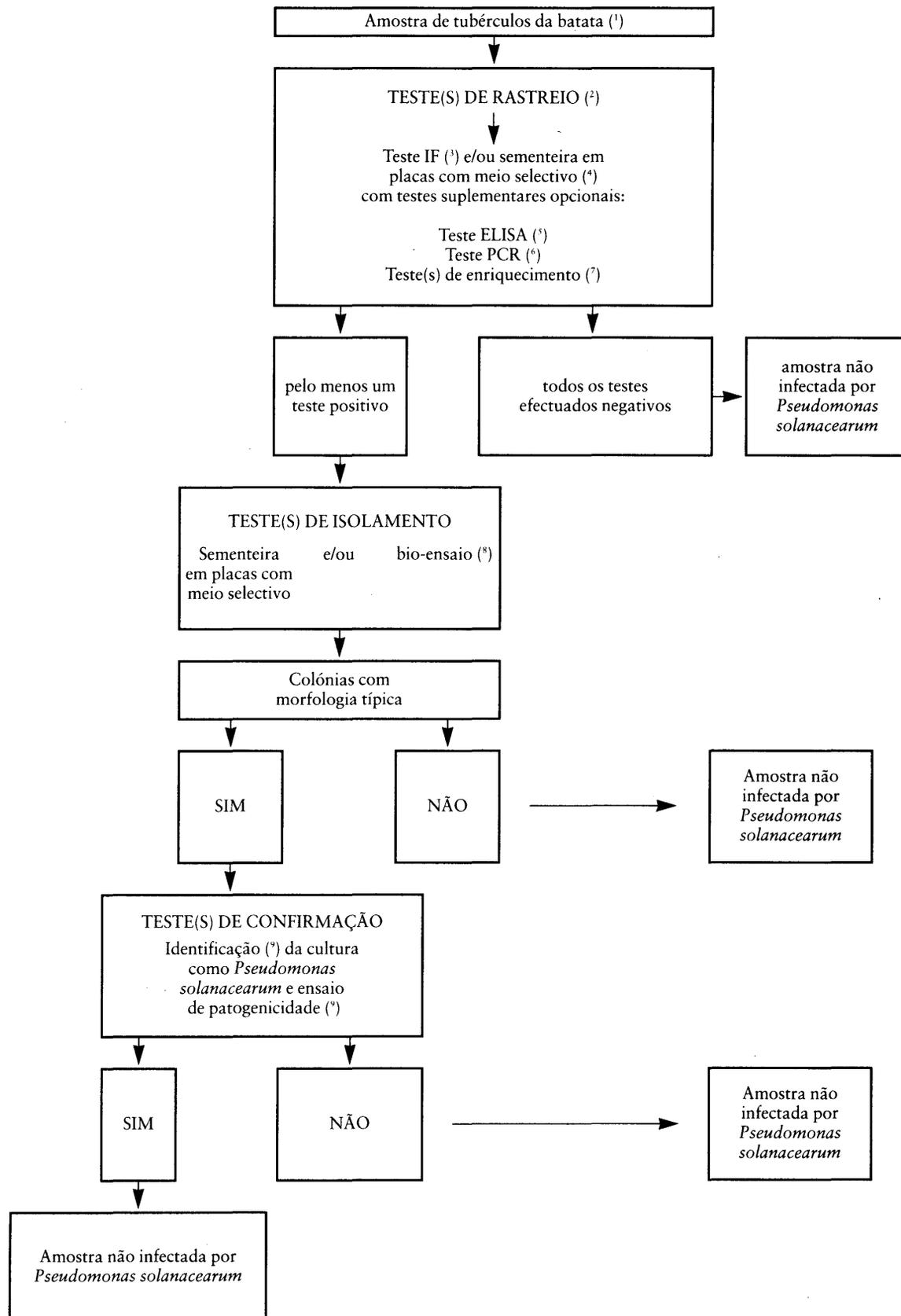
Referências do fluxograma:

- (¹) A descrição dos sintomas é apresentada na secção II.1.
- (²) Testes rápidos de rastreio facilitam um diagnóstico inicial.
- O testes adequados são:
- teste de exsudação do tecido vascular do caule (secção II.2),
 - teste para detecção de grânulos de poli- β -hidroxibutirato (secção II.2),
 - teste IF (secção III.2),
 - teste ELISA (secção III.3),
 - teste PCR (secção III.4).
- (³) Embora o isolamento do patogénio através de diluição em placas a partir de material vegetal que apresente sintomas típicos seja simples, o isolamento poderá não ser possível em fases avançadas de infecção. As bactérias saprófitas que se desenvolvem nos tecidos afectados podem ter um crescimento mais rápido ou inibir o patogénio no meio de cultura. Se não for possível isolar a bactéria, apesar de os sintomas de doença serem típicos, o isolamento deverá ser repetido, de preferência através de um teste de sementeira em placas com meio selectivo.
- (⁴) A identificação fiável de uma cultura pura de *Pseudomonas solanacearum* é alcançada através de, pelo menos, um dos testes mencionados na secção II.4.1, em combinação com um teste de patogenicidade (secção II.4.3). A caracterização da estirpe é opcional, mas recomendada para cada novo caso.

2. Detecção e identificação de *Pseudomonas solanacearum* em amostras de tubérculos de batateira

Este procedimento destina-se à detecção de infecções latentes em tubérculos de batateira por um ou, de preferência, mais teste(s) de rastreio que, se positivos, são complementados pelo isolamento do patogénio, seguido, no caso do isolamento de colónias típicas, da identificação de uma cultura pura como *Pseudomonas solanacearum*.

Apresentação do fluxograma:



Referências do fluxograma:

(1) Dimensão da amostra

A dimensão normal da amostra é de 200 tubérculos. Contudo, este procedimento pode ser aplicado a amostras com menos de 200 tubérculos.

(2) Teste(s) de rastreio

Um teste único poderá não ser suficientemente sensível ou fiável para detectar *Pseudomonas solanacearum* numa amostra. Portanto, recomenda-se que seja efectuado mais de um teste. Sempre que possível, estes testes deverão, de preferência, basear-se em diferentes princípios biológicos.

(3) Teste de imunofluorescência (IF)

O teste ID é um teste de rastreio bem estabelecido, o que representa uma vantagem sobre os outros testes que não estão ainda completamente desenvolvidos e validados. Este teste é utilizado para muitas outras bactérias de quarentena, como por exemplo *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*. Com os parâmetros de leitura especificados neste método, este teste é sensível (limiar de sensibilidade de 10^3 - 10^4 células por ml de sedimento de extracto de batata).

O factor crítico para determinação da fiabilidade do resultado do teste é a qualidade do anti-soro. Apenas um anti-soro com um título elevado (mínimo 2 000 para o anti-soro cru) é aceitável e todos os testes têm que ser efectuados com o anti-soro no seu título ou com uma diluição abaixo do título. Dá-se preferência ao método indirecto. Os métodos directos podem ser aplicados se tiverem níveis de sensibilidade e de especificidade equivalentes aos do método indirecto.

O teste IF tem a vantagem de possibilitar uma interpretação subjectiva da morfologia das células coradas e da intensidade de fluorescência, que fornecem informações acerca da especificidade da reacção. São comuns a reacções cruzadas por parte de bactérias do solo ou associadas aos tecidos de batateira serologicamente relacionadas ou com a morfologia celular de *Pseudomonas solanacearum*. O teste IF pode ser utilizado como único teste de rastreio, embora nos testes em que se suspeite da existência de reacções cruzadas deva ser feito um teste de rastreio adicional baseado em diferentes princípios biológicos. Nesses casos, a sementeira em placas com meio selectivo é o teste mais apropriado.

(4) Sementeira em placas com meio selectivo

Utilizando o meio SMSA modificado e a metodologia especificada neste método, este é um teste sensível e selectivo para *Pseudomonas solanacearum*. O resultado está disponível 3 a 6 dias após a preparação das amostras. O patógeno é isolado directamente em cultura e pode ser facilmente identificado. Para tirar o máximo partido das suas capacidades, o teste requer uma preparação cuidada dos hilos, de forma a evitar bactérias secundárias associadas aos tubérculos da batateira, bactérias essas que são concorrentes com *Pseudomonas solanacearum* no meio e que podem afectar o desenvolvimento do patógeno. Algumas estirpes podem exibir um crescimento deficiente devido ao facto dos componentes do meio também serem selectivos em relação ao organismo alvo. Também é necessário estar atento de forma a diferenciar *Pseudomonas solanacearum* de outras bactérias que possam desenvolver-se no meio. A sementeira em placas com meio selectivo pode ser utilizada como o único teste de rastreio, embora deva ser feito um segundo teste de rastreio quando se obtém um resultado negativo e se suspeite da inibição de *Pseudomonas solanacearum* por parte de outras bactérias presentes no meio. Nesses casos, o tipo de teste mais apropriado é o IF.

(5) Teste ELISA

O teste ELISA tem geralmente um limiar de sensibilidade menor do que o teste IF (10^4 — 10^5 células por ml de sedimento de extracto de batata). O teste é económico e rápido mas geralmente mais sujeito ao aparecimento de falsos resultados positivos (reacções cruzadas) e de falsos resultados negativos (inibição pelas moléculas fenólicas do extracto de batata). As exigências relativas à especificidade do anti-soro são extremamente elevadas. O teste ELISA não pode ser utilizado como o único teste de rastreio.

(6) Teste PCR

A PCR é, potencialmente, um teste que permite um rastreio extremamente sensível, embora seja facilmente inibido por componentes do extracto de planta ou do tubérculo, daí resultando falsos resultados negativos. Algumas cultivares de batateira contêm mais inibidores que outras. É portanto necessário eliminar estes inibidores. A inibição pode ser reduzida através da diluição, mas à custa da diluição das populações de *Pseudomonas solanacearum*. Têm que ser tomadas precauções durante todas as etapas de preparação da amostra e do teste para evitar contaminações, que resultariam em falsos resultados positivos. Falsos resultados positivos podem igualmente surgir a partir da homologia de sequências de outros organismos. Por estes motivos, a PCR directa não pode ser utilizada como único método de rastreio.

(7) Teste de enriquecimento

A incubação de amostras de sedimentos de extracto da batata em meio líquido semi-selectivo, como o caldo SMSA modificado, permite a multiplicação de *Pseudomonas solanacearum*. Talvez mais importante, dilui também os potenciais inibidores dos testes ELISA e PCR. Portanto, *Pseudomonas solanacearum* em meio enriquecido pode ser detectada pelos testes IF, ELISA e PCR. Não se recomenda que seja feita a sementeira em placas directamente a partir dos meios enriquecidos. Os métodos de enriquecimento não foram ainda extensivamente ensaiados e testados. Estão aqui incluídos porque têm um bom potencial. No entanto, devido à relativa falta de experiência com os mesmos, não podem ser utilizados como únicos métodos de detecção.

(8) Bio-ensaio

O bio-ensaio é utilizado para o isolamento de *Pseudomonas solanacearum* a partir de sedimentos de extractos de batata, através de um enriquecimento selectivo numa planta hospedeira. Os bio-ensaios podem ser efectuados em plantas de tomateiro ou de beringela. O teste requer condições óptimas de incubação, especificadas neste método. Não é provável que as bactérias inibidoras de *Pseudomonas solanacearum* na meio SMSA interfiram neste teste.

(9) Teste de confirmação

A identificação fiável de uma cultura pura de *Pseudomonas solanacearum* é alcançada por, pelo menos, um dos testes mencionados na secção II.4.1, em combinação com um teste de patogenicidade (secção II.4.3). A caracterização da estirpe é opcional mas recomendada para cada novo caso.

SECÇÃO II

DIAGNÓSTICO DO MAL MURCHO DA BATATEIRA EM PLANTAS E TUBÉRCULOS DE BATATEIRA

1. Sintomas do mal murcho da batateira

Planta da batateira

Na fase inicial de infecção, verifica-se uma murchidão das folhas na parte superior da planta a temperaturas elevadas e durante o dia, com recuperação à noite. A murchidão torna-se rapidamente irreversível, resultando na morte da planta. O tecido vascular dos caules de plantas afectadas cortados transversalmente pode tornar-se castanho e uma exsudação leitosa escorre da superfície cortada ou pode ser facilmente extraída apertando o caule com os dedos. Quando um caule cortado é colocado verticalmente em água, há um escorrimento viscoso a partir dos feixes vasculares.

Tubérculo de batateira

Os tubérculos de batateira têm que ser cortados transversalmente junto do hilo (estolho). Na fase inicial da infecção há uma coloração amarela vítrea ou castanha clara no anel vascular, pelo qual emerge espontaneamente, após alguns minutos ou quando é aplicada uma ligeira pressão com os polegares junto da superfície cortada, uma exsudação de cor creme clara. Mais tarde, a coloração torna-se castanha mais evidente e a necrose pode alastrar ao parênquima. Nas fases mais avançadas, a infecção alastra a partir do hilo e dos olhos, podendo observar-se lesões na casca, de cor vermelha acastanhada e em ligeira depressão, a partir das quais se pode manifestar exsudação bacteriana que origina a adesão de partículas de terra.

2. Testes rápidos de rastreio

Testes rápidos de rastreio facilitam o diagnóstico inicial. Utilizar um ou mais dos seguintes testes:

Teste de exsudação do caule

A presença de *Pseudomonas solanacearum* em caules de batateira com sintomas de murchidão pode ser avaliada através de um simples teste inicial:

Cortar o caule imediatamente acima do nível do solo. Colocar a superfície cortada num recipiente com água. Pouco tempo depois, haverá uma exsudação bacteriana espontânea a partir dos anéis vasculares. Qualquer outra bactéria que provoque infecção vascular em plantas de batateira não exibirá este fenómeno.

Deteção de grânulos de poli-β-hidroxibutirato (PHB)

Os grânulos de PHB nas células de *Pseudomonas solanacearum* são visualizados através da coloração com azul de Nilo A ou com negro de Sudão B.

Preparar um esfregaço a partir do exsudado ou com uma suspensão do tecido necrosado numa lâmina de microscópio, ou então preparar um esfregaço de uma cultura de 48 horas em YPGA ou SPA (apêndice 1). Preparar esfregaços de controlo positivo da estirpe Biovar 2/Raça 3 e, se necessário, um esfregaço de uma estirpe heteróloga como controlo negativo. Deixar secar. Passar rapidamente a parte de baixo da lâmina à chama várias vezes, até que o esfregaço esteja fixo.

Teste azul de Nilo

1. Corar o esfregaço fixo na lâmina com uma solução aquosa a 1% de azul de Nilo A. Incubar durante 10 minutos a uma temperatura de 55°C.
2. Escorrer a solução corante. Lavar brevemente e com cuidado em água corrente. Retirar o excesso de água com papel de filtro.
3. Lavar o esfregaço com uma solução aquosa a 8% de ácido acético. Incubar durante 1 minuto à temperatura ambiente.
4. Lavar com cuidado em água da torneira corrente. Secar com papel de filtro.
5. Voltar a humedecer com uma gota de água. Cobrir com uma lamela.
6. Examinar o esfregaço corado em microscópio de epifluorescência a 450 nm, com lente de imersão em óleo, e uma ampliação de 1 000 x.

Os grânulos de PHB apresentam uma fluorescência laranja vivo. Observar também com luz normal para verificar se os grânulos são intracelulares e se a morfologia das células é típica de *Pseudomonas solanacearum*.

Teste negro de Sudão

1. Corar o esfregaço fixo na lâmina com uma solução a 0,3 % de negro de Sudão B em etanol a 70 %. Incubar durante 10 minutos à temperatura ambiente.
2. Escorrer a solução corante. Lavar brevemente e com cuidado em água da torneira corrente. Retirar o excesso de água com papel de filtro.
3. Mergulhar o esfregaço brevemente em xilol. Secar com papel de filtro.
Cuidado! O xilol é um produto nocivo. Trabalhar em «hotte».
4. Lavar o esfregaço com uma solução aquosa a 0,5 % (p/v) de safranina e deixar durante 10 segundos à temperatura ambiente.
Cuidado! A safranina é um produto nocivo. Trabalhar em «hotte».
5. Lavar com cuidado em água corrente. Secar com papel de filtro. Cobrir com uma lamela.
6. Examinar o esfregaço corado em microscópio com luz transmitida com lente de imersão em óleo e uma ampliação de 1 000 x. Os grânulos de PHB em células de *Pseudomonas solanacearum* apresentam uma coloração azul negra. As paredes celulares apresentam uma coloração rosa.

Outros testes

Outros testes de rastreio considerados apropriados são o teste IF (secção III.2), o teste ELISA (secção III.3) e o teste PCR (secção III.4).

3. Isolamento

- 3.1. Retirar o exsudado ou secções do tecido necrosado do anel vascular do tubérculo ou da zona vascular do caule da planta. Preparar uma suspensão num pequeno volume de água destilada esterilizada ou de tampão fosfato 50 mM. Deixar em repouso durante 5 a 10 minutos.
- 3.2. Preparar uma série de diluições decimais da suspensão, por exemplo 1/10 e 1/100, ou mais se consideradas necessárias.
- 3.3. Transferir um volume padrão da suspensão para um meio nutritivo geral (NA, YPGA e SPA, apêndice 1) e/ou para o meio de tetrazólio de Kelman (apêndice 1) e/ou para o meio selectivo SMSA (apêndice 7). Espalhar ou riscar com uma técnica adequada de diluição em placas. Se se considerar necessário, preparar um conjunto separado de placas com cada um dos meios de cultura utilizados e com uma suspensão diluída de células de uma estirpe virulenta de Biovar 2/Raça 3 de *Pseudomonas solanacearum* como controlo positivo.
- 3.4. Incubar as placas durante 3 dias a uma temperatura de 28°C. A incubação pode ser prolongada até 6 dias se o crescimento for lento mas, frequentemente, as colónias em placas com SMSA tornam-se atípicas e as células bacterianas morrem.

Em meios nutritivos gerais, os isolamentos virulentos de *Pseudomonas solanacearum* produzem colónias de cor de pérola, planas, irregulares e fluidas, exibindo muitas vezes espirais características.

Em meio de tetrazólio de Kelman, as colónias típicas de isolamentos virulentos de *Pseudomonas solanacearum* são cremes, planas, irregulares e fluidas, com espirais de cor vermelha viva no centro. Formas avirulentas de *Pseudomonas solanacearum* desenvolvem colónias butirosas vermelho-escuras.

Em meio SMSA, os isolamentos virulentos de *Pseudomonas solanacearum* produzem colónias brancas leitosas, planas, irregulares e fluidas, com centros vermelho vivo bem distintos.

As formas avirulentas de *Pseudomonas solanacearum* desenvolvem no meio SMSA colónias menos fluidas, completamente rosas a vermelhas.

- 3.5. Purificar as colónias com morfologia característica através de subcultura num meio nutritivo. Evitar a repicagem regular de subculturas, que pode induzir uma perda de virulência.

4. Teste(s) de confirmação

4.1. Identificação de *Pseudomonas solanacearum*

Identificar as culturas puras de *Pseudomonas solanacearum* através de, pelo menos, um dos seguintes procedimentos:

Testes nutricionais e enzimáticos

Nota: Incluir estirpes apropriadas de controlo para cada teste utilizado.

As seguintes características fenotípicas de *Pseudomonas solanacearum* estão universalmente presentes ou ausentes:

Pigmento fluorescente	-
Inclusões de PHB	+
Teste de oxidação/fermentação (O/F)	O+/F-
Catalase	+
Oxidase de Kovacs	+
Redução dos nitratos	+
<hr/>	
Utilização de citrato	+
Crescimento a 40 °C	-
<hr/>	
Crescimento em NaCl a 1 %	+
Crescimento em NaCl a 1 %	-
Hidrólise da arginina	-
Liquefação da gelatina	-
Hidrólise de amido	-
Hidrólise de esculina	-
Produção de levana	-

Os meios de cultura e métodos de ensaio estão descritos em Lelliott & Stead (1987).

Teste IF

Preparar uma suspensão de 10^6 células por ml a partir da cultura e de uma estirpe de controlo positivo. Preparar uma série de diluições de anti-soro, com duas ordens de diluição. Aplicar o procedimento IF (secção III.2). O título de IF da cultura tem que ser equivalente ao do controlo positivo.

Teste ELISA

Preparar uma suspensão com uma concentração superior a 10^6 células por ml a partir da cultura e de uma estirpe de controlo positivo. Aplicar o procedimento ELISA (secção III.3). O valor ELISA da cultura tem que ser equivalente ao do controlo positivo.

Teste PCR

Preparar uma suspensão de 10^6 células por ml a partir da cultura e de uma estirpe de controlo positivo. Aplicar o procedimento da PCR (secção III.4). O produto da PCR da cultura tem que ter a mesma dimensão e padrão da análise enzimática restritiva (REA) do controlo positivo.

Hibridização fluorescente *in situ* (FISH)

Preparar uma suspensão de 10^6 células por ml da cultura e de uma estirpe de controlo positivo. Aplicar o procedimento FISH (van Beuningen *et al.*, 1995) com o «primer» OLI-1 (Seal *et al.*, 1993). A cultura tem de manifestar a mesma reacção que o controlo positivo.

Perfil proteico

As proteínas desnaturadas de células inteiras são separadas através de electroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) (Stead, 1992a).

Perfil de ácidos gordos (FAP)

Incubar a cultura e uma estirpe de controlo positivo durante 48 horas a uma temperatura de 28 °C em agar de soja tripticase e aplicar o procedimento FAP (Janse, 1991; Stead, 1992a; Stead, 1992b). O perfil da cultura tem de ser idêntico ao do controlo positivo. Nas condições especificadas, os ácidos gordos característicos são 14:0 3OH, 16:0 2OH, 16:1 2OH e 18:1 2OH.

4.2. Caracterização da estirpe

A caracterização da estirpe é opcional mas recomendada para cada novo caso, utilizando, pelo menos, um dos seguintes:

Determinação da biovar

A *Pseudomonas solanacearum* é dividida em biovars com base na capacidade de produzir ácido a partir de três álcoois de hexose e três açúcares (Hayward, 1964 & 1994):

	Biovar				
	1	2	3	4	5
Utilização de:					
— maltose	-	+	+	-	+
— lactose	-	+	+	-	+
— celobiose	-	+	+	-	+
— manitol	-	-	+	+	+
— sorbitol	-	-	+	+	-
— dulcitol	-	-	+	+	-

Testes suplementares diferenciam a Biovar 2 em subfenótipos (Hayward, 1994):

	Biovar 2	Biovar 2-A	Biovar 2-T
Utilização de trealose	-	+	+
Utilização de inositol	+	-	+
Utilização de D-ribose	-	-	+
Actividade pectolítica	baixa	baixa	alta

Determinação da raça

A raça (Buddenhagen *et al.*, 1962) é determinada com base no teste de patogenicidade em plantas de tomateiro, beringela ou tabaco e através de um teste de avaliação da reacção de hipersensibilidade (HR) em folhas de tabaco (Lozano & Sequeira, 1970):

	Raça (*)		
	1	2	3
Reacção em:			
— plantas de tomateiro/beringela	murchidão	sem reacção	murchidão
— plantas de tabaco	murchidão	sem reacção	sem reacção
— folhas de tabaco	necrose (48 h) e murchidão (7-8 dias)	HR (12-24 h)	clorose (2-8 dias)

(*) A raça 4 (patogénica para gíngera e poucos mais hospedeiros) e a raça 5 (patogénica exclusivamente para amoreira) não estão incluídas.

A caracterização da raça através de testes de patogenicidade ou hipersensibilidade em folhas de tabaco pode não ser muito fiável pelo que poderá ser deduzida a partir da biovar e do hospedeiro natural de origem.

A cultura pode ser ainda caracterizada através de:

Impressão digital genómica

A diferenciação molecular das estirpes do complexo *Pseudomonas solanacearum* pode ser feita através de:

Análise RFLP (Cook *et al.*, 1989)

Sequenciação repetitiva de PCR [REP-, ERIC- & BOX-PCR (Louws *et al.*, 1995; Smith *et al.*, 1995)]

4.3. Teste de patogenicidade

A finalidade deste teste é a confirmação da virulência das culturas identificadas como *Pseudomonas solanacearum*.

Preparar inóculos de 10⁶ células por ml a partir da cultura e de uma estirpe de controlo positivo. Inocular 5-10 plantas de tomateiro ou beringela de preferência no estádio de terceira folha verdadeira ou mais velha (secção III.6). Incubar até 2 semanas a uma temperatura de 22-28°C e elevada humidade relativa, regando diariamente. Observar sintomas de murchidão e/ou epinastia, clorose, nanismo.

Proceder ao isolamento a partir de plantas com sintomas:

- remover uma secção de tecido do caule 2 cm acima do ponto de inoculação,
- fragmentá-la e suspendê-la num pequeno volume de água destilada esterilizada ou tampão fosfato 50 mM e semear, incubar e observar a presença de colónias típicas de *Pseudomonas solanacearum*.

SECÇÃO III

DETECÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE *PSEUDOMONAS SOLANACEARUM* EM AMOSTRAS DE TUBÉRCULOS DE BATATEIRA

Nota: A dimensão normal da amostra é de 200 tubérculos. Contudo, este procedimento pode ser aplicado a amostras com menos de 200 tubérculos.

1. Preparação da amostra para o ensaio

Nota: Os sedimentos de extracto de batata obtidos através deste protocolo também podem ser utilizados para a detecção de *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*.

Opções pré-teste, se consideradas úteis:

- i) incubar a amostra a uma temperatura de 25-30°C durante um período de até 2 semanas, para favorecer a multiplicação das baixas populações de *Pseudomonas solanacearum*,
- ii) lavar os tubérculos em água corrente com desinfectantes e detergentes adequados. Secar os tubérculos ao ar.

- 1.1. Retirar a pele na zona do hilo do tubérculo com um bisturi ou faca de cortar legumes, limpos e desinfectados, de forma a que os tecidos vasculares fiquem visíveis. Retirar cuidadosamente um núcleo cónico (3-5 mm de diâmetro) de tecido vascular na zona do hilo de cada tubérculo. Limitar ao máximo a quantidade de tecido não vascular. Processar cada um dos tubérculos que constituem a amostra.

Nota: O exame visual dos tubérculos (secção II.1) pode ser feito nesta fase. Pôr de lado qualquer tubérculo que exiba sintomas ou severas podridões e testá-los separadamente (secção II).

- 1.2. Recolher os hilos num recipiente fechado. Os hilos devem ser, de preferência, processadas de imediato. Se tal não for possível, guardá-los durante 24 horas ou nunca mais de 72 horas, a uma temperatura de 4°C.

- 1.3. Processar os hilos de acordo com um dos seguintes procedimentos:

- i) Transferir os hilos para um recipiente adequado.
Adicionar um volume adequado de tampão de maceração (apêndice 2) de forma a cobrir o material.
Fragmentar o material num misturador Waring Blender ou Ultra Thurrax até à homogeneização completa. Evitar uma homogeneização exagerada.
Deixar o macerado repousar durante 15-30 minutos.
- ii) Transferir os hilos para um recipiente adequado.
Adicionar um volume adequado de tampão de maceração de forma a cobrir o material.
Colocar o recipiente num agitador rotativo.
Incubar a uma velocidade de 50 a 100 r.p.m. durante 4 horas a uma temperatura de 20-22°C ou durante 16-24 horas a uma temperatura de 4°C.
- iii) Transferir os hilos para um saco de maceração descartável forte (por exemplo, um saco Stomacher com 105 × 150 mm, esterilizado por radiação).
Esmagar cuidadosamente os hilos com uma ferramenta adequada, por exemplo um martelo, até à homogeneização completa.
Adicionar um volume suficiente de tampão de maceração, de forma a cobrir o material.
Deixar o macerado sedimentar durante 15-30 minutos.

- 1.4. Extrair as bactérias dos hilos processados através de um dos seguintes procedimentos:

- i) Decantar o macerado com cuidado para um tubo de centrifugação, deixando os resíduos no recipiente ou saco. Se o macerado estiver turvo após decantação, centrifugar a não mais de 180 g durante 10 minutos, a uma temperatura inferior a 10°C.
Centrifugar o macerado decantado, ou o sobrenadante resultante da primeira etapa de centrifugação, a 7 000 g durante 15 minutos ou a 10 000 g durante 10 minutos a uma temperatura inferior a 10°C.
Desprezar o sobrenadante sem perturbar o sedimento.
- ii) Filtrar o macerado através de um sistema de filtração com dimensão de poro de 40-100 µm. Intensificar a filtração utilizando uma bomba de vácuo.
Recolher o filtrado num tubo de centrifugação.
Lavar o filtro com tampão de maceração.
Centrifugar o filtrado a 7 000 g durante 15 minutos ou a 10 000 g durante 10 minutos, a uma temperatura inferior a 10°C.
Desprezar o sobrenadante sem perturbar o sedimento.

- 1.5. Ressuspender o sedimento em 1 ml de tampão de sedimentação (apêndice 2).
Dividir em duas partes iguais e transferir cada parte para um microtubo.
Utilizar um microtubo para os testes. Durante o ensaio, conservar o extracto restante a uma temperatura de 4°C.
Adicionar uma solução a 10-25% (v/v) de glicerol esterilizado ao outro microtubo. Agitar em *vortex*. Armazenar a uma temperatura de -18°C (semanas) ou de -70°C (meses).
2. **Teste IF**
- Utilizar anti-soro para *Pseudomonas solanacearum*, de preferência para a Biovar 2/Raça 3. Determinar o título com uma suspensão de 10⁶ células por ml da estirpe homóloga de *Pseudomonas solanacearum*, com uma diluição adequada do conjugado de isotiocianato de fluoresceína (FITC), de acordo com as recomendações do fabricante. O anti-soro não purificado deverá ter um título de IF de, pelo menos, 1:2 000.
- Utilizar lâminas de microscópio com vários poços, de preferência 10, com, pelo menos, 6 mm de diâmetro.
- Incluir um controlo de conjugado FITC em cada lâmina. O teste deverá ser repetido, com um controlo de PBS incluído, no caso de ser observado qualquer resultado positivo no controlo de FITC.
- Preparar lâminas de controlo positivo em separado, com uma suspensão de 10⁶ células por ml de uma de *Pseudomonas solanacearum* estirpe de Biovar/Raça apropriadas. Incluir uma lâmina em cada conjunto de testes.
- 2.1. Preparar as lâminas através de um dos seguintes processos:
- i) Para sedimentos com relativamente pouco amido:
Pipetar um volume padrão de sedimento ressuspenso para cada um dos poços de uma fila (15 µl é adequado para um poço com 6 mm de diâmetro — aumentar o volume à escala para poços maiores). A fila de poços restante pode ser utilizada como um duplicado ou para outra amostra, como indicado na figura 1.
- ii) Para outros sedimentos:
Preparar diluições decimais, isto é, 1/10, 1/100 e 1/1 000 do sedimento ressuspenso em tampão de sedimentação. Pipetar um volume padrão (15 µl é adequado para poços com 6 mm de diâmetro — aumentar o volume à escala para poços maiores) do sedimento ressuspenso e de cada uma das diluições numa fila de poços. A fila de poços restante pode ser utilizada como duplicado ou para uma segunda amostra, como indicado na figura 2.
- 2.2. Deixar secar as gotículas. Fixar as células bacterianas na lâmina através de aquecimento, à chama ou com etanol a 95%.
- 2.3. Procedimento para IF:
- i) De acordo com a preparação da lâmina descrita em 2.1.i):
Preparar um conjunto de diluições do anti-soro em tampão IF (apêndice 3): 1/4 do título (T/4), 1/2 do título (T/2), o título (T) e duas vezes o título (2T).
- ii) De acordo com a preparação da lâmina descrita em 2.1.ii):
Preparar a diluição de trabalho (DT) do anti-soro em tampão IF. A diluição de trabalho é a diluição do anti-soro com especificidade óptima e é normalmente igual a metade do título.

Figura 1

Preparação da lâmina de acordo com os pontos 2.1.i) e 2.3.i)

Uma diluição padrão do sedimento ressuspenso

(T = Título)

	FITC	T/4	T/2	T	2T	⇒ Diluições do anti-soro
Amostra 1	● 1	● 2	● 3	● 4	● 5	
Duplicado da amostra 1 ou amostra 2	● 6	● 7	● 8	● 9	● 10	

Figura 2

Preparação da lâmina de acordo com os pontos 2.1.ii) e 2.3.ii)

	FITC		Diluição padrão do anti-soro			⇒ Diluição decimal do sedimento ressuspenso
	Puro	Puro	1/10	1/100	1/1 000	
Amostra 1	● 1	● 2	● 3	● 4	● 5	
Duplicado da amostra 1 ou amostra 2	● 6	● 7	● 8	● 9	● 10	

- 2.3.1. Dispor as lâminas sobre papel de filtro humedecido.
Cobrir os poços da amostra com a(s) diluição(ões) de anti-soro. Juntar PBS aos poços de FITC. O volume de anti-soro adicionado aos poços deve ser equivalente ao volume de extracto utilizado.
- 2.3.2. Incubar na obscuridade durante 30 minutos à temperatura ambiente.
- 2.3.3. Eliminar as gotículas de anti-soro da lâmina e enxaguar as lâminas cuidadosamente com tampão IF. Lavar durante 5 minutos em tampão IF-Tween e subsequentemente durante 5 minutos em tampão IF (apêndice 3).
Retirar cuidadosamente o excesso de humidade.
- 2.3.4. Dispor as lâminas sobre papel de filtro humedecido.
Cobrir os poços da amostra e o poço FITC com a diluição do conjugado FITC utilizada para determinar o título. O volume de conjugado FITC adicionado aos poços deve ser idêntico ao volume de anti-soro utilizado.
- 2.3.5. Incubar na obscuridade durante 30 minutos à temperatura ambiente.
- 2.3.6. Eliminar as gotículas de conjugado FITC. Enxaguar e lavar como anteriormente (ponto 2.3.3).
Retirar cuidadosamente o excesso de humidade.
- 2.3.7. Pipetar 5-10 μ l de uma solução 0,1 M de tampão fosfato com glicerol (apêndice 3) ou líquido de montagem similar para cada poço e cobrir com uma lamela.
- 2.4. Leitura do teste IF
Examinar as lâminas do teste num microscópio de epifluorescência, com filtros adequados para excitação do FITC, sob lente de imersão em óleo, a uma ampliação de 500-1 000 \times . Examinar os poços ao longo de dois diâmetros perpendiculares e à volta do perímetro.
Observar primeiro a lâmina do controlo positivo. As células devem apresentar-se com uma fluorescência brilhante e completamente coradas.

Nota: O teste deve ser repetido se a coloração for aberrante.

Ler as lâminas do teste. Observar primeiro a ausência de células fluorescentes nos poços de controlo FITC. Células fluorescentes no controlo de FITC indicam ligação não específica do conjugado, autofluorescência ou contaminação.

Nota: Repetir o teste se tal for observado.

Observar células fluorescentes brilhantes e com a morfologia característica de *Pseudomonas solanacearum* nos poços das lâminas. A intensidade de fluorescência deve ser equivalente à da estirpe do controlo positivo, para a mesma diluição do anti-soro. As células com coloração incompleta ou com fluorescência fraca não devem ser consideradas, a não ser que sejam muito abundantes (ver interpretação dos resultados do teste IF).

Interpretação dos resultados do teste IF

- Se não forem detectadas células fluorescentes brilhantes e com a morfologia característica, o teste IF é negativo.
- Se forem detectadas células fluorescentes brilhantes e com a morfologia característica, determinar o número médio de células por cada campo do microscópio e calcular o número de células por ml (N) de sedimento ressuspenso (apêndice 4).

Uma população de aproximadamente 10^3 células por ml de sedimento ressuspenso é considerada como sendo o limite de detecção para o teste IF:

- para as amostras com $N > 10^3$ células por ml, o teste IF é considerado positivo,
- para as amostras com $N < 10^3$ células por ml, o teste IF pode ser considerado positivo.

- iii) Se números mais elevados ($N > 10^5$ células por ml) de células, desigual ou incompletamente coradas ou fracamente fluorescentes forem observadas com o anti-soro no seu título, um segundo teste deve ser realizado:
- ou um teste baseado num princípio biológico distinto,
 - ou uma repetição do teste IF, utilizando um segundo anti-soro ou uma diluição decimal do sedimento.

3. Teste ELISA

(Baseado em Robinson-Smith *et al.*, 1995)

Utilizar anti-soro para *Pseudomonas solanacearum*, de preferência para a Biovar 2/Raça 3. Determinar o título com uma suspensão de 10^6 células por ml de uma estirpe homóloga de *Pseudomonas solanacearum*.

Recomenda-se a utilização de microplacas NUNC Polysorp.

Incluir um controlo negativo constituído pelo extracto de batata e um controlo de tampão fosfato salino (PBS).

Utilizar uma suspensão de $> 10^6$ células por ml de uma estirpe de *Pseudomonas solanacearum* de Biovar/Raça apropriadas como controlo positivo. Testar de forma idêntica à da(s) amostra(s), mas dela(s) bem separada na microplaca.

- 3.1. Pipetar 100-200 μl do sedimento ressuspense para um microtubo.
Aquecer durante 4 minutos a uma temperatura de 100°C. Retirar o microtubo e colocá-lo em gelo.
- 3.2. Adicionar um volume igual de tampão carbonato de revestimento 2x (apêndice 5). Agitar em *vortex*.
- 3.3. Colocar alíquotas de 100 μl em *pelo menos* dois dos poços da microplaca. Incubar durante 1 hora a uma temperatura de 37°C ou de um dia para o outro a uma temperatura de 4°C.
- 3.4. Retirar os extractos dos poços. Lavar os poços três vezes com PBS-Tween (apêndice 5), deixando a última solução de lavagem dentro dos poços durante, pelo menos, 5 minutos.
- 3.5. Preparar uma diluição adequada de anti-soro de *Pseudomonas-solanacearum* em tampão de bloqueio (apêndice 5). Adicionar 100 μl da diluição de anti-soro aos poços.
Incubar durante 1 hora a uma temperatura de 37°C.
- 3.6. Retirar o anti-soro dos poços. Lavar os poços como anteriormente (ponto 3.4).
- 3.7. Preparar uma diluição adequada de conjugado de fosfatase alcalina em tampão de bloqueio. Adicionar 100 μl da diluição do conjugado aos poços.
Incubar durante 1 hora a uma temperatura de 37°C.
- 3.8. Retirar o conjugado dos poços. Lavar os poços como anteriormente (pontos 3.4 e 3.6).
- 3.9. Preparar a solução do substrato de fosfatase alcalina (apêndice 5). Adicionar 100 μl aos poços. Incubar entre 30 minutos e 1 hora, na obscuridade, à temperatura ambiente.
- 3.10. Ler a absorvância a 409 nm.

Interpretação do teste ELISA

O teste ELISA é negativo se a densidade óptica (DO) da amostra for $< 2 \times \text{DO}$ do controlo negativo.

O teste ELISA é positivo se a densidade óptica (DO) da amostra for $> 2 \times \text{DO}$ do controlo negativo.

4. Teste PCR

(Baseado em Seal *et al.*, 1993)

Nota: Têm de se utilizar pontas de pipeta com filtro durante todas as etapas de preparação das amostras e durante outras manipulações que envolvam a PCR.

Preparar uma suspensão de 10^6 células por ml de uma estirpe de Biovar 2/Raça 3 de *Pseudomonas solanacearum* como controlo positivo. Testar de forma idêntica à da(s) amostra(s).

- 4.1. Pipetar 100 μl do sedimento ressuspense para um microtubo.

Em alternativa, transferir 90 μl do sedimento ressuspense para um microtubo contendo 10 μl de hidróxido de sódio 0,5 M. Misturar invertendo repetidamente o microtubo.

- 4.2. Aquecer durante 4 minutos a uma temperatura de 100°C. Retirar de imediato o microtubo e colocá-lo em gelo.
- 4.3. Preparar pelo menos duas diluições decimais, por exemplo, 1/10 e 1/100 ou mais, se consideradas necessárias, em água destilada esterilizada ou ultra pura (UPW).
- 4.4. Preparar a mistura de reacção da PCR (apêndice 6) num tubo esterilizado adicionando os componentes pela ordem que se segue:

Para um volume de reacção de 50 µl

Componente	Quantidade	Concentração final
Água destilada esterilizada ou UPW	30,8 µl-33,8 µl	—
Tampão PCR 10×	5,0 µl	1×
d-ATP	1,0 µl	0,2 mM
d-CTP	1,0 µl	0,2 mM
d-GTP	1,0 µl	0,2 mM
d-TTP	1,0 µl	0,2 mM
«Primer» OLI-1 (20 µM)	2,5 µl	1 µM
«Primer» Y-2 (20 µM)	2,5 µl	1 µM
Taq Polimerase (5U/µl)	0,2 µl	1,0 U
Volume total	45 µl-48 µl	

Para mais reacções

Calcular a quantidade de cada componente para o número de reacções necessário. Misturar os componentes e transferir 45 µl-48 µl da mistura para tubos de PCR esterilizados. Manter os tubos com a mistura da PCR em gelo.

Para volumes de reacção de 25 µl

Reduzir proporcionalmente a quantidade dos componentes.

- 4.5. Amplificação pela PCR
- 4.5.1. Opcional: centrifugar de forma intermitente os tubos com a amostra fervida e o controlo positivo.
- Adicionar, pela ordem especificada, 2-5 µl da(s) amostra(s), controlo de água e controlo positivo aos tubos contendo a mistura de reacção PCR. Colocar os tubos no bloco de aquecimento do termociclador de DNA.
- 4.5.2. Correr o seguinte programa:
- 1 ciclo de:
- i) 2 minutos a uma temperatura de 96°C: desnaturação da amostra original
- 50 ciclos de:
- ii) 20 segundos a uma temperatura de 94°C: desnaturação
- iii) 20 segundos a uma temperatura de 68°C: emparelhamento dos «primers»
- iv) 30 segundos a uma temperatura de 72°C: extensão da cópia
- 1 ciclo de:
- v) 10 minutos a uma temperatura de 72°C: continuação da extensão
- 1 ciclo de:
- vi) manter a uma temperatura de 4°C
- Nota:* Estes são os parâmetros para o aparelho Perkin Elmer 9600. Outros termocicladores poderão necessitar de uma camada de óleo mineral nos tubos de reacção da PCR e/ou modificação da duração das etapas ii), iii) e iv) do programa de amplificação.
- 4.5.3. Retirar os tubos do termociclador. Analisar o produto da PCR. Se não for analisado de imediato, armazenar os tubos a uma temperatura de 4°C para utilização no próprio dia ou a uma temperatura de -18°C durante mais tempo.
- 4.6. Análise do produto da PCR
- Os fragmentos da PCR são detectados através de electroforese em gel de agarose e coloração com brometo de etídio.
- 4.6.1. Preparar um gel de agarose adequado, fervendo a agarose cuidadosamente em tampão tris acetato de electroforese (TAE).

- 4.6.2. Arrefecer a agarose fundida a uma temperatura de 50-60°C. Deitar no molde da unidade de electroforese e inserir o pente. Deixar a solução solidificar.
- 4.6.3. Retirar o pente. Submergir o gel em TAE de forma a que fique ligeiramente coberto (2-3 mm) pelo tampão.
- 4.6.4. Colocar gotículas de 3 µl de tampão de carregamento em parafilme. Adicionar 12 µl do produto da PCR de qualquer uma das amostras, do controlo positivo e do controlo de água e misturar através de aspiração ligeira na ponta da pipeta antes de carregar. Os volumes indicados podem ser modificados de acordo com a capacidade dos poços do gel de agarose.
- 4.6.5. Encher cuidadosamente os poços do gel. Como referência, incluir pelo menos num dos poços um marcador de DNA adequado.
- 4.6.6. Ligar os cabos à fonte de alimentação e à tina de electroforese. Submeter o gel a uma carga de 5-8 V/cm até que a frente de corrida esteja a 1 cm da extremidade do gel.
- 4.6.7. Desligar a fonte de alimentação. Desligar os cabos da tina de electroforese. Retirar cuidadosamente o gel. Mergulhá-lo numa solução de brometo de etídio durante 30 a 45 minutos.
- Nota:* Utilizar luvas descartáveis sempre que manusear o brometo de etídio, pois é um potente agente mutagénico!
- 4.6.8. Retirar o corante em excesso em água destilada durante 10-15 minutos.
- 4.6.9. Visualizar o(s) fragmento(s) de DNA num transluminador com UV. O produto PCR de *Pseudomonas solanacearum* com o conjunto de «primers» OLI-1 e Y-2 tem 288 bp de comprimento. Comparar com o marcador de DNA e o controlo positivo.
- Nota:* O controlo da água tem que ser sempre negativo. Se for positivo, repetir o teste.
- 4.6.10. Se for necessário um registo permanente, tirar uma fotografia ao gel.
- 4.6.11. Confirmar a autenticidade do fragmento amplificado através de análise de restrição enzimática (REA — Restriction enzyme analysis).
- 4.7. Análise de restrição enzimática (REA)
- 4.7.1. Transferir 8,5 µl do produto da PCR (ponto 4.5.3) para um microtubo novo. Adicionar 1 µl de tampão da enzima 10 × concentrado e 0,5 µl da enzima de restrição Avall.
- 4.7.2. Misturar através de ligeira aspiração na ponta da pipeta. Se permanecerem gotículas nas paredes do tubo, centrifugar de forma intermitente na microcentrifugadora. Incubar durante 1 hora a uma temperatura de 37°C.
- 4.7.3. Analisar o fragmento da PCR digerido através de electroforese em gel de agarose, como anteriormente (ponto 4.6).
- Interpretação do resultado do teste PCR*
- O teste PCR é negativo se o fragmento característico de 288 bp não for detectado e se o fragmento for detectado para a estirpe do controlo positivo de *Pseudomonas solanacearum*.
- O teste PCR é positivo se o fragmento característico de 288 bp for detectado e se a análise REA do fragmento amplificado for idêntica à da estirpe do controlo positivo de *Pseudomonas solanacearum*.
5. **Teste de sementeira em placas com meio selectivo**
- (Baseado em Elphinstone *et al.*, 1996)
- 5.1. Efectuar o teste através de uma técnica de diluição em placas adequada, por exemplo:
- Preparar, pelo menos, duas diluições decimais, ou seja 1/10 e 1/100 de sedimento ressuspense em tampão de sedimentação. Pipetar um volume padrão (50-100 µl) do sedimento ressuspense e de cada diluição para meio selectivo SMSA modificado (apêndice 7) e espalhar com uma vareta de vidro sobre toda a superfície do meio.
Se for considerado útil, fazer uma diluição através de riscado com uma ansada de 10 µl de sedimento ressuspense. Passar a ansa pela chama entre cada uma das inoculações;
 - Transferir um volume padrão (50-100 µl) do sedimento ressuspense para o meio selectivo SMSA modificado e espalhar com uma vareta de vidro sobre toda a superfície do meio. Repetir o procedimento, sem passar a vareta pela chama, em mais duas placas de SMSA modificado.
- 5.2. Inocular, através da mesma técnica de diluição em placas, uma suspensão de 10⁶ células por ml a partir de uma estirpe de *Pseudomonas solanacearum* Biovar 2/Raça 3, como controlo positivo, num conjunto de placas de SMSA modificado.
- 5.3. Incubar as placas a uma temperatura de 28°C. Começar a ler as placas após 3 dias de incubação. Se negativo, incubar mais tempo, até 6 dias. As colónias de isolamentos virulentos de *Pseudomonas solanacearum* apresentam-se brancas, de aspecto leitoso, achatadas, irregulares e fluidas, com centros vermelhos vivos e apresentando estrias ou espirais internas.
- 5.4. Purificar as colónias com morfologia típica através de subcultura em meio nutritivo geral (apêndice 1).

- 5.5. Identificar as culturas puras (secção II.4.1) e confirmar as culturas de *Pseudomonas solanacearum* através de um teste de patogenicidade (secção II.4.3).

Interpretação do resultado da sementeira em placas com meio selectivo

O teste de sementeira em placas com meio selectivo é negativo se não for isolada nenhuma colónia ao fim de seis dias ou se não forem isoladas colónias características de *Pseudomonas solanacearum*, desde que não se suspeite de inibição por colónias de outras bactérias e que colónias características de *Pseudomonas solanacearum* sejam detectadas nos controlos positivos.

O teste de sementeira em placas com meio selectivo é positivo se forem isoladas colónias características de *Pseudomonas solanacearum*.

6. **Bio-ensaio**

(Baseado em Janse, 1988)

- 6.1. Para cada amostra, utilizar 10 plântulas (plântulas susceptíveis de tomateiro ou beringela) no estágio de terceira folha verdadeira. Não regar as plântulas nas 24 horas anteriores à inoculação.
- 6.2. Distribuir 100 µl do sedimento ressuspensão entre as plântulas. Inocular o caule, entre os cotilédones e em um ou mais locais.
- 6.3. Inocular, através da mesma técnica, 10 plântulas com uma suspensão de 10⁶ células por ml de uma estirpe de Biovar 2/Raça 3 de *Pseudomonas solanacearum*, como controlo positivo, e com tampão de sedimentação, como controlo negativo. Separar as plântulas que constituem o controlo positivo das outras plântulas a fim de evitar contaminações cruzadas.
- 6.4. Deixar crescer as plântulas durante 4 semanas a uma temperatura de 22-28°C e elevada humidade relativa, com rega diária. Observar o desenvolvimento de sintomas de murchidão, epinastría, clorose e/ou nanismo.
- 6.5. Fazer isolamentos a partir das plântulas infectadas (secção II). Identificar culturas puras com morfologia característica (secção II.4.1) e confirmar as culturas de *Pseudomonas solanacearum* através de um teste de patogenicidade (secção II.4.3).
- 6.6. Se se considerar necessário, verificar a ausência de infecção nos lotes de plântulas ensaiadas que não demonstram sinais de infecção. Retirar de cada plântula uma secção de 1 cm de caule, 2 cm acima do ponto de inoculação. Homogeneizar os tecidos em tampão de maceração. Proceder à diluição em placas (secção III.5.1). Se o resultado for positivo, identificar culturas puras com morfologia característica (secção II.4.1) e confirmar as culturas de *Pseudomonas solanacearum* através de um teste de patogenicidade (secção II.4.3).

Interpretação do resultado do bio-ensaio

O bio-ensaio é negativo se as plântulas ensaiadas não estiverem infectadas por *Pseudomonas solanacearum* e se *Pseudomonas solanacearum* for detectada no controlo positivo.

O bio-ensaio é positivo se as plântulas ensaiadas estiverem infectadas por *Pseudomonas solanacearum*.

7. **Teste de enriquecimento**

(Baseado em Elphinstone *et al.*, 1996)

- 7.1. Transferir 100 µl do sedimento ressuspensão para 3 ml de meio líquido SMSA modificado (apêndice 7).
- 7.2. Incubar durante 48 horas, e nunca mais de 72 horas, a uma temperatura de 28°C, com a tampa do tubo apertada frouxamente para permitir o arejamento.
- 7.3. Apertar a tampa e agitar em *vortex*. Separar em alíquotas para o teste IF (ponto 2 da presente secção), o teste ELISA (ponto 3 da presente secção) e/ou o teste PCR (ponto 4 da presente secção).

8. **Testes de patogenicidade**

Ver secção II 4.3.

Apêndice 1

Meios de cultura para *Pseudomonas solanacearum*

Agar nutritivo (NA)

Agar nutritivo (Difco)	23 g
Água destilada	1 l

Preparar volumes de 0,5 l de meio em frascos de 1 l.

Dissolver os ingredientes.

Esterilizar em autoclave a 121 °C durante 15 minutos.

Arrefecer a 50 °C. Preparar placas.

Agar de levedura-peptona-glucose (YPGA)

Extracto de levedura (Difco)	5 g
Bacto-peptona (Difco)	5 g
D(+)-glucose (monohidrato)	10 g
Bacto agar (Difco)	15 g
Água destilada	1 l

Preparar volumes de 0,5 l de meio em frascos de 1 l.

Dissolver os ingredientes.

Esterilizar em autoclave a 121 °C durante 15 minutos.

Arrefecer a 50 °C. Preparar placas.

Agar de sacarose e peptona (SPA)

Sacarose	20 g
Peptona	5 g
K ₂ HPO ₄	0,5 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,25 g
Bacto agar (Difco)	15 g
Água destilada	1 l

Preparar volumes de 0,5 l de meio em frascos de 1 l.

Dissolver os ingredientes. Se necessário, acertar o pH a 7,2-7,4.

Esterilizar em autoclave a 121 °C durante 15 minutos.

Arrefecer a 50 °C. Preparar placas.

Meio de tetrazólio de Kelman

Casaminoácidos (Difco)	1 g
Bacto peptona (Difco)	10 g
Dextrose	5 g
Bacto agar (Difco)	15 g
Água destilada	1 l

Preparar volumes de 0,5 l de meio em frascos de 1 l.

Dissolver os ingredientes. Esterilizar em autoclave a 121 °C durante 15 minutos.

Arrefecer a 50 °C.

Adicionar o volume necessário de solução aquosa de cloreto de trifetil tetrazólio (Sigma), esterilizada por filtração, para obter uma concentração final de 50 mg/l. Preparar placas.

*Apêndice 2***Materiais para preparação das amostras**

Tampão de maceração: tampão fosfato 50 mM, pH 7,0

Este tampão é utilizado para maceração dos tecidos.

Na ₂ HPO ₄	4,26 g
KH ₂ PO ₄	2,72 g
Água destilada	1 l

Dissolver os ingredientes e verificar o pH. Preparar as alíquotas que forem consideradas necessárias.

Esterilizar em autoclave a 121 °C durante 15 minutos.

Para a realização do teste PCR directo, recomenda-se a adição de polivinilpirrolidona 40 000 MWT (PVP-40) a 5 %, para reduzir a incidência de inibição da amplificação por moléculas aromáticas presentes no extracto.

No caso de se utilizarem os procedimentos de homogeneização com Waring Blender ou com Ultra Turrax para a maceração dos hilos de batata, recomenda-se a adição de um anti-floculante, antiespuma ou antioxidante.

Flocos de Lubrol	0,5 g/l
Antiespuma DC Silicone	1 ml/l
Pirofosfato tetrassódico	1 g/l

Esterilizar separadamente em autoclave. Adicionar de forma a obter a concentração desejada.

Tampão de sedimentação: tampão fosfato 10 mM, pH 7,2

Este tampão é utilizado para a ressuspensão e diluição dos sedimentos dos hilos de batata.

Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	2,7 g
NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O	0,4 g
Água destilada	1 l

Dissolver os ingredientes e verificar o pH. Preparar as alíquotas que forem consideradas necessárias.

Esterilizar em autoclave a 121 °C durante 15 minutos.

*Apêndice 3***Materiais para o teste IF**

Tampão IF: tampão fosfato salino (PBS) 10 mM, pH 7,2

Este tampão é utilizado para a diluição dos anti-soros.

Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	2,7 g
NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O	0,4 g
NaCl	8,0 g
Água destilada	1 l

Dissolver os ingredientes e verificar o pH. Preparar as alíquotas que forem consideradas necessárias.

Esterilizar em autoclave a 121 °C durante 15 minutos.

Tampão IF-Tween

Este tampão é utilizado para lavar as lâminas. Adicionar 0,1% de Tween 20 ao tampão IF.

Tampão fosfato com glicerol 0,1 M, pH 7,6

Este tampão é utilizado como fluido de montagem nos poços das lâminas de IF, para aumentar a fluorescência.

Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	3,2 g
NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O	0,15 g
Glicerol	50 ml
Água destilada	100 ml

Apêndice 4

Determinação do nível de contaminação no teste IF

Área (S) de cada poço da lâmina de poços múltiplos:

$$= \frac{\pi D^2}{4} \quad (1)$$

em que D = diâmetro do poço.

Área (S) do campo da objectiva:

$$= \frac{\pi d^2}{4} \quad (2)$$

em que d = diâmetro do campo.

Calcular d quer por medição directa quer através das seguintes fórmulas:

$$s = \frac{\pi i^2}{G^2 K^2 \times 4} \quad (3)$$

em que: i = coeficiente de campo (depende do tipo de ocular e varia entre 8 e 24),

K = coeficiente do tubo (1 ou 1,25),

G = ampliação da objectiva (100x, 40x, etc.).

de (2), vem que

$$d = \sqrt{\frac{4s}{\pi}} \quad (4)$$

de (3), vem que

$$d = \sqrt{\frac{4 \times \frac{\pi i^2}{G^2 K^2 \times 4}}{\pi}} = \frac{i}{GK}$$

Contar o número de células fluorescentes típicas por campo (c).

Calcular o número de células fluorescentes típicas por poço (C):

$$C = c \frac{S}{s}$$

Calcular o número de células fluorescentes típicas por ml de sedimento (N):

$$N = C \times \frac{1\,000}{y} \times F$$

em que: y = volume de sedimento no poço,

F = factor de diluição do sedimento.

Apêndice 5

Materiais para o teste ELISA

Tampão carbonato 2 × para revestimento, pH 9,6

Na₂CO₃ 6,36 g

NaHCO₃ 11,72 g

Água destilada 1 l

Dissolver os ingredientes e verificar o pH. Preparar as alíquotas que forem consideradas necessárias.

Esterilizar em autoclave a 121 °C durante 15 minutos.

Pode ser acrescentado, como antioxidante, sulfito de sódio com uma concentração final de 0,2 %, caso o extracto contenha uma grande fracção de moléculas aromáticas.

Tampão fosfato salino (PBS) 10 ×, pH 7,4

NaCl 80 g

KH₂PO₄ 2 g

Na₂HPO₄ · 12H₂O 29 g

KCl 2 g

Água destilada 1 l

Dissolver os ingredientes e verificar o pH. Preparar as alíquotas que forem consideradas necessárias.

Esterilizar em autoclave a 121 °C durante 15 minutos.

Tampão fosfato salino — Tween (PBS-T)

PBS 10 × 100 ml

Solução a 10 % de Tween 20 5 ml

Água destilada 895 ml

Tampão de bloqueio (anticorpo) — deve ser preparado na altura da utilização

PBS 10 × 10 ml

Polivinilpirrolidona-44 000 MWT (PVP-44) 2 g

Solução a 10 % de Tween 20 0,5 g

Leite em pó 0,5 g

Água destilada perfazer 100 ml

Solução de substrato de fosfatase alcalina, pH 9,8

Dietanolamina 97 ml

Água destilada 800 ml

Misturar e acertar a pH 9,8 com HCl concentrado.

Completar até 1 l com água destilada.

Juntar 0,2 g de MgCl₂.

Dissolver duas pastilhas de 5 mg cada de substrato fosfatase (Sigma) por cada 15 ml de solução.

Apêndice 6

Materiais para o teste PCR

Sequência dos oligonucleótidos

«Primer» OLI-1 5'-GGGGGTAGCTTGCTACCTGCC-3'

«Primer» Y-2 5'-CCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGT-3'

Os materiais encontram-se referidos em Seal *et al.*, 1993.

Apêndice 7

Materiais para a sementeira em placas com meio selectivo e testes de enriquecimento

Meio selectivo SMSA (Engelbrecht, 1994, modificado por Elphinstone *et al.*, 1996)

Meio basal

Casaminoácidos (Difco)	1 g
Bacto peptona (Difco)	10 g
Glicerol	5 ml
Bacto agar (Difco)	15 g
Água destilada	1 l

Preparar volumes de 0,5 l de meio em frascos de 1 l.

Dissolver os ingredientes e verificar o pH. Se necessário, acertar o pH a 6,5 antes de esterilizar. *Pseudomonas solanacearum* não se desenvolve bem a pH > 7,0.

Esterilizar em autoclave a 121 °C durante 15 minutos.

Arrefecer a 50 °C.

Juntar os ingredientes seguintes (todos Sigma) para obter as concentrações finais especificadas:

Violeta cristal	5 mg/l		
Sulfato de polimixina B	100 mg/l	(cerca de 600 000 unidades)	Sigma P-1004
Bacitracina	25 mg/l(*)	(cerca de 1 250 unidades)	Sigma B-0125
Cloranfenicol	5 mg/l		Sigma C-3175
Penicilina-G	0,5 mg/l	(cerca de 825 unidades)	Sigma P-3032
Sais de tetrazólio	50 mg/l		

Dissolver os ingredientes em etanol a 70% de forma a obter as concentrações indicadas para o volume de meio preparado. Alguns desses ingredientes, como por exemplo o sulfato de polimixina B e o cloranfenicol, exigem ligeiro aquecimento e agitação.

Caldo SMSA (Elphinstone *et al.*, 1996)

Preparar de forma idêntica à do meio selectivo SMSA excluindo a adição de agar.

Distribuir em alíquotas de 3 ml por tubos universais de 30 ml descartáveis.

(*) Se for considerado necessário, o aumento da concentração de bacitracina para 300 ppm pode reduzir a contaminação por bactérias saprófitas, sem reduzir a recuperação de *Pseudomonas solanacearum*.

Bibliografia

- Buddenhagen, I.W.; Sequeira, L. and Kelman, A. 1962. Description of races in *Pseudomonas solanacearum*. *Phytopathology* 52, 726.
- Cook, D.; Elizabeth B. and Sequeira L. 1989. Genetic diversity of *Pseudomonas solanacearum*: detection of restriction fragment length polymorphism with DNA probes that specify virulence and hypersensitive responses. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 2, 113-121.
- Dinesen I.G. and DeBoer, S.H. 1995. Extraction of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* from composite samples of potato tubers. *American Potato Journal* 72, 133-142.
- Elphinstone, J.G.; Hennessy, J.; Wilson, J. and Stead, D.E. 1996. Sensitivity of different methods for the detection of *Pseudomonas solanacearum* (Smith)Smith in potato tuber extracts. *EPPO Bulletin* 26.
- Engelbrecht, M.C. 1994. Modification of a semi-selective medium for the isolation and quantification of *Pseudomonas solanacearum*. *ACIAR Bacterial Wilt Newsletter* 10, 3-5.
- Hayward, A.C. 1964. Characteristics of *Pseudomonas solanacearum*. *Journal of Applied Bacteriology* 27, 265-277.
- Hayward, A.C. 1994. Systematic and phylogeny of *Pseudomonas solanacearum* and related bacteria. In: *Bacterial Wilt: the disease and its causative agent*, *Pseudomonas solanacearum* (eds. A.C. Hayward and G.L. Hartman), CAB International Oxford, 127-135.
- Janse, J.D. 1988. A detection method for *Pseudomonas solanacearum* in symptomless potato tubers and some data on its sensitivity and specificity. *EPPO Bulletin* 18, 343-351.
- Janse, J.D. 1991. Infra- and intraspecific classification of *Pseudomonas solanacearum* strains using whole cell fatty acid analysis. *Systematic and Applied Microbiology* 14, 335-345.
- Kelman, A. 1954. The relationship of pathogenicity in *Pseudomonas solanacearum* to colony appearance on a tetrazolium medium. *Phytopathology* 64, 693-695.
- Lelliot, R.A. and Stead, D.E. 1987. *Methods for the diagnosis of bacterial diseases of plants*. (T.F. Preece ed.), Blackwell Scientific Publications, Oxford. 216 pp.
- Louws, F.J.; Fulbright, D.W.; Stephens, C.T. and De Bruijn, F.J. 1995. Differentiation of genomic structure by rep-PCR fingerprinting to rapidly classify *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Phytopathology* 85, 528-536.
- Lozano, J.C. and Sequeira, L. 1970. Differentiation of races of *Pseudomonas solanacearum* by a leaf infiltration technique. *Phytopathology* 60, 838.
- Mirza, M.S.; Rademaker, J.W.L.; Janse, J.D. and Akkermans, A.D.L. 1993. Specific 16S ribosomal RNA targeted oligonucleotide probe against *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*. *Canadian Journal of Microbiology* 39, 1029-1034.
- Robinson-Smith, A.; Jones, P.; Elphinstone, J.G. and Forde, S.M.D. 1995. Production of antibodies to *Pseudomonas solanacearum*, the causative agent of bacterial wilt. *Food and Agricultural Immunology* 7, 67-79.
- Seal, S.E.; Jackson, L.A.; Young, J.P.W. and Daniels, M.J. 1993. Differentiation of *Pseudomonas solanacearum*, *P. syzygii*, *P. picketti* and the blood disease bacterium by partial 16S rRNA sequencing: construction of oligonucleotide primers for sensitive detection by polymerase chain reaction. *Journal of General Microbiology* 139, 1587-1594.
- Smith, J.J.; Offord, L.C.; Holderness, M. and Saddler, G.S. 1995. Genetic diversity of *Burkholderia solanacearum* (synonym *Pseudomonas solanacearum*) race 3 in Kenya. *Applied and Environmental Microbiology* 61, 4262-4268.
- Stead, D.E. 1992a. Techniques for detecting and identifying plant pathogenic bacteria. In: *Techniques for rapid detection of plant pathogens* (eds. J.M. Duncan and L. Torrance). Blackwell Scientific Publications, Oxford, 76-111.
- Stead, D.E. 1992b. Grouping of plant pathogenic and some other *Pseudomonas* spp. using cellular fatty acid profiles. *International Journal of Systematic Bacteriology* 42, 281-295.
- Van Beuningen, A.; Derks, H. and Janse J.D. 1995. Detection and identification of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* with special attention to fluorescent *in-situ* hybridisation (FISH) using a 16S rRNA targeted oligonucleotide probe. *Züchtungsforschung* 2, 266-269.