



VÍRUS DETECTADOS EM GERMOPLASMA VEGETAL INTRODUZIDO NO BRASIL PELO LABORATÓRIO DE QUARENTENA (2004-2007)

Vera L. A. Marinho¹

Viviane S. Anjos²

Fátima M. Batista³

INTRODUÇÃO

Os vírus constituem um grupo importante de pragas de plantas, sendo causadores de doenças extremamente danosas para a agricultura. Esses vírus podem estar associados às sementes e aos materiais de propagação vegetativa, introduzidos no país, sendo um risco potencial para a agricultura brasileira. A dificuldade de detecção, identificação e posterior erradicação destes organismos, torna o princípio da prevenção da doença, através da exclusão da praga, extremamente importante. Para tal, o Laboratório de Quarentena, da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Unidade de Virologia, analisa todo o germoplasma introduzido no país, garantindo a integridade fitossanitária do mesmo.

¹ Bióloga, PhD, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

² Estudante de Agronomia, União Pioneira de Integração Social - UPIS

³ Engenheiro Agrônomo, PhD, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

LABORATÓRIO DE QUARENTENA

Em maio de 1977, a Portaria N° 224, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) autorizou a Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (Cenargen) a executar o intercâmbio e a quarentena de germoplasma vegetal destinado à pesquisa. Em 2002 o Laboratório de Quarentena Vegetal do Cenargen foi credenciado pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) como Estação Quarentenária Nível 1 (*Estação quarentenária com capacidade de detectar e identificar pragas quarentenárias em nível de espécie e que dispõe de*

UNIDADE DE VIROLOGIA

A Unidade de Virologia destina-se a detecção e identificação de vírus, viróides e fitoplasmas em germoplasma vegetal importado.

De maneira geral, o diagnóstico dessas pragas é baseado em: 1. Detecção do agente patogênico por enxertia ou inoculação mecânica de plantas indicadoras (métodos biológicos); 2. Colocação em evidência de moléculas imunogênicas sintetizadas pelo agente patogênico (métodos imunológicos); 3. Revelação da seqüência de ácidos nucleicos específicos ao genoma do agente patogênico (métodos moleculares) (MARINHO, 2001).

Vários métodos são utilizados na detecção e na identificação de vírus, dependendo do material vegetal recebido.

instalações adequadas e especialistas renomados nas áreas de virologia, acarologia, nematologia, micologia, bacteriologia, entomologia e plantas invasoras – Portaria N° 214, Instrução Normativa N° 16, de 29/12/1999).

O Laboratório de Quarentena Vegetal conta com seis Unidades de pesquisa especializada: Acarologia, Bacteriologia, Entomologia, Micologia, Nematologia e **Virologia**. Cada unidade possui estrutura e metodologias próprias para detecção, identificação, caracterização e erradicação dessas pragas (MARINHO *et al.*, 2003).

Entre os métodos mais utilizados para o diagnóstico destacam-se:

- **Plantio em quarentenário e observação de sintomas em plântulas:** O material vegetal recebido é estabelecido (semeado ou plantado) em caixas com solo esterilizado e mantidos em quarentenário para observação de sintomas típicos causados por vírus em plântulas (mosaico, deformação foliar, super brotamento, estrias, epinastia, mancha anelar, clorose e/ou necrose). Caso sejam observados alguns desses sintomas, procede-se a coleta do material infectado para a execução de testes específicos (**Fig. 1**).



Fig. 1: Plantio em quarentenário para observação de sintomas em plântulas. (Foto: Vera Marinho, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia)

Inoculação Mecânica em plantas

hospedeiras: Folhas de plântulas apresentando sintoma são coletadas, trituradas em tampão fosfato e o suco distribuído sobre as folhas das plantas indicadoras, previamente pulverizadas com uma fina camada de carborundum. A inoculação é realizada com o dedo ou

cotonete. Após a inoculação, as plantas são lavadas com água corrente para retirar o excesso de carborundum. Espera-se em torno de sete dias para o aparecimento de sintomas de lesões locais e 14 dias para o aparecimento de sintomas sistêmicos (Fig. 2).



Fig. 2: Sintomas de lesões locais em folhas de *Chenopodium amaranticolor* e sintomas sistêmicos em folhas de *Chenopodium quinoa* (Fotos: Fátima Batista e Vera Marinho, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia)

Microscopia Eletrônica (ME): Duas técnicas são utilizadas para observar a presença de partículas de vírus em uma planta infectada. São elas: (i) "Leaf-dip" (KITAJIMA, 1965) - Folhas mostrando sintomas de vírus são cortadas em pequenos pedaços e colocadas em uma gota de 1% silicotungstato de sódio ou de acetato de uranila, substâncias utilizadas para contraste em ME. Sobre a gota com o material triturado, coloca-se uma

telinha de cobre (específica para ME) e deixa-se por 2 minutos. A telinha é retirada do líquido e, após remover o excesso de líquido da mesma, pode-se então examiná-la ao Microscópio Eletrônico. (ii) Secções ultrafinas (KARNOVSKY, 1965) - Pedaços pequenos de tecido vegetal (folhas, caule, raízes, etc.), provenientes de plantas infectadas, são fixados em 2% de glutaraldeído/paraformaldeído em tampão

cacodilato de sódio (0.02 M, pH 7,2) por uma noite. Após lavagem do material em tampão cacodilato, os fragmentos são pós-fixados em tetróxido de ósmio (1% em tampão cacodilato 0.05 M) por 2 horas. Em seguida, os fragmentos são lavados com água destilada e colocados em acetato de uranila (0.5% solução) por uma noite. Desidratam-se os fragmentos em acetona 50, 70, 90% (uma vez) e 100% (3 vezes). No passo seguinte, o material é colocado em

uma mistura de resina/acetona (1:1) por 4 horas e em resina pura por uma noite. A polimerização é feita em um molde de silicone a 70° C por 72 horas. Secções ultrafinas (50 nm) são realizadas utilizando-se ultramicrotomo e coradas com acetato de uranila (3%) por 20 minutos e em citrato de chumbo por 10 minutos. As secções ultrafinas são montadas em telinha de cobre e observadas ao microscópio eletrônico (Fig. 3).

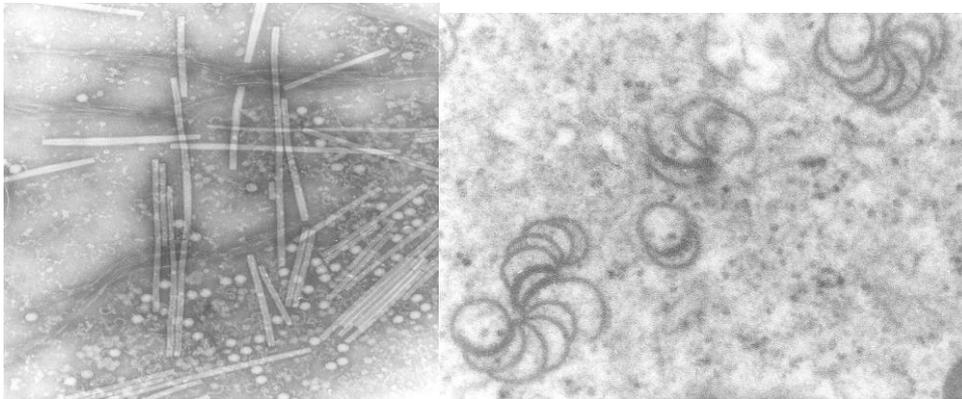


Fig. 3: Micrografias eletrônicas de partículas de vírus alongados e esféricos e de inclusões causadas por potyvírus. (Foto: Vera Marinho, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia)

Sorologia: O teste imunológico utilizado para identificação do vírus associado ao sintoma observado é o DAS-ELISA (SALAZAR, 1982). Nesse teste, o material com sintoma (antígeno) é triturado em presença do tampão de extração e conservado em geladeira antes do uso. Nos orifícios de uma placa de poliestireno (próprias para o teste de ELISA), é colocado o IgG específico (antissoro) para o vírus a ser testado e incuba-se a placa por 3 horas à 37°C. Após esse tempo, a placa é lavada 4 vezes, com espaço de 3 minutos entre cada lavagem, com tampão PBS, são colocados nos orifícios da placa as amostras a serem

testadas (antígeno) e a mesma é mantida em geladeira (4°C) por uma noite. Repete-se aqui a lavagem da placa e os orifícios são cobertos com uma solução de conjugado (anticorpo + enzima) e a placa incubada de 3 a 4 horas a 37°C ou à temperatura ambiente por 5 horas. Repete-se aqui mais uma lavagem da placa, adiciona-se o substrato da enzima em cada orifício e a placa é deixada à temperatura ambiente. Depois de 1 hora, é realizada uma primeira leitura do resultado. A intensidade da coloração da reação é proporcional à concentração de vírus na amostra (Fig. 4).

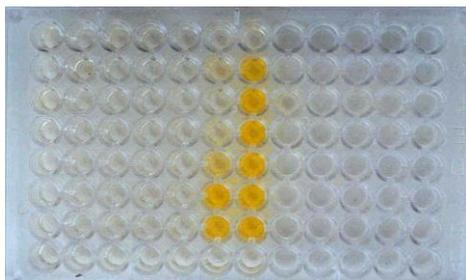


Fig. 4: Placa de ELISA mostrando reação positiva (orifícios amarelos). (Foto: Vera Marinho, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia)

PCR:

Suspeitando-se (através dos sintomas e levantamento bibliográfico) do vírus que está infectando o material vegetal a analisado, extrai-se o DNA ou RNA total (a maioria dos vírus de plantas possui RNA como ácido nucléico) e utiliza -se esse ácido nucléico como modelo para a reação PCR, com “primers” específicos para o vírus a ser detectado. Quando a seqüência a ser detectada é constituída de RNA, como é o caso da grande maioria dos vírus de plantas,

a reação PCR deve ser precedida de uma transcrição inversa do RNA viral (RT) em DNA complementar (cDNA). O ciclo, compreendendo as etapas de desnaturação, hibridização e alongamento, é repetido de 30 a 60 vezes. Após o término da reação PCR, o produto de amplificação é revelado em gel de agarose 1%, corado com brometo de etidium e observado sob luz ultra - violeta (**Fig. 5**) (HADIDI et al., 1993; HALPERN & HILLMAN, 1996).

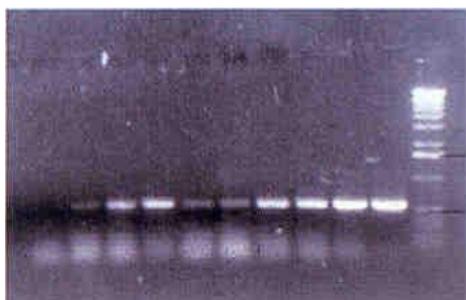


Fig. 5: Gel de agarose revelado com brometo de etidium e observado sob luz ultra - violeta, mostrando produtos de amplificação após PCR. (Foto: Vera Marinho, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia)

INTERCEPTAÇÃO DE VÍRUS (2004 – 2007)

Durante o período compreendido entre janeiro de 2004 à julho de 2007,

foram analisados pela Unidade de Virologia), 59.317 acessos de germoplasma vegetal, procedentes de 30 países. Os países que mais enviaram germoplasma para o Brasil

foram, Estados Unidos, Argentina, México, Peru e Chile e os produtos mais recebidos no período foram, milho, trigo, soja, melão e algodão.

Neste período foram detectados e interceptados os seguintes vírus no material vegetal analisado: *Soybean mosaic vírus* – SMV (vírus do mosaico comum da soja) (Fig. 6), em sementes de soja importadas da Argentina e o *Banana streak vírus* – BSV (Fig. 7), em mudas de bananeira importadas da Costa Rica (MARINHO & BATISTA, 2004). As metodologias de diagnóstico utilizadas para a detecção e identificação do SMV foram, plantio das sementes de soja em quarentenário, observação de sintomas em plântulas e teste de ELISA com antissoro específico para o vírus em questão. Para as plântulas de bananeira, utilizou-se teste de ELISA com antissoro específico para o BSV e para a confirmação do diagnóstico, utilizou-se PCR, com um par de “primers” específico para BSV. Os resultados foram positivos em todos os testes realizados. Embora os vírus detectados já estejam presentes no Brasil, não é descartada a

possibilidade da presença de novas estirpes que podem ser mais agressivas para as culturas em questão. No caso do BSV, por se tratar de mudas provenientes de uma matriz infectada, o risco ainda seria maior pela presença do vírus em todas as plantas quando estabelecidas no campo.

Não existe tratamento químico que erradique vírus do material vegetal infectado. As sementes de soja infectadas com o SMV foram liberadas para o destinatário com a observação de que as plantas deveriam ser acompanhadas durante todo o período da cultura e as plantas com sintomas eliminadas evitando assim a disseminação desse vírus por inseto vetor. No caso das plântulas infectadas com o BSV, o lote foi incinerado devido ao perigo de introdução de um grande número de plantas infectadas numa área ou região.

Como não existe tratamento específico para combater viroses, a detecção das mesmas no material introduzido, antes de ir para o campo, é fundamental para a prevenção e o controle dessas pragas.



Fig. 6: Enrugamento e deformação foliar, sintomas causados, em folhas de soja, pelo *Soybean mosaic vírus* – SMV (Vírus do mosaico da soja) (Foto: <http://www.omafra.gov.on.ca/english/crops/pub811/4mosaic.htm>)



Fig. 7: Folhas de bananeiras mostrando sintomas de estrias causadas pelo *Banana streak vírus* – BSV (Vírus da estria da bananeira), (Foto: L. Gasparotto, Embrapa Amazônia Ocidental)

BIBLIOGRAFIA

HADIDI, A, MONTASSER, M. S. & LEVY, L. Detection of potato leafroll and strawberry mild yellow-edge luteoviruses by reverse transcription-polymerase chain reaction amplification. *Plant Disease*, v.75, p.595-601, 1993.

HALPERN, B.T. & HILLMAN, B L. Detection of blueberry scorch virus strain NI 2 by reverse transcriptase-polymerase chain reaction amplification. *Plant Disease*, v.80, p.219-222, 1996.

KARNOVSKY, M.J.A. A formaldehyde glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. *Journal of Cell Biology*, v.27, p.137A-138A. 1965.

KITAJIMA, E.W. A rapid method to detect particles of some spherical plant viruses in fresh preparations. *Journal of Electron Microscopy*, v.14, p.119-121, 1965.

MARINHO, V. L. A. Técnicas imunológicas e moleculares no diagnóstico de vírus de

plantas, In: *Revisão Anual de Patologia de Plantas*, Editor, Luz, W. C. vol. 9, pág. 383-402. 2001.

MARINHO, V. L. A., MENDES, M.A.S, TENENTE, R. C. V., BATISTA, M. F. , OLIVEIRA, M. R. V. , MARQUES, A.S.A., URBEN, A. F., FONSECA, J. N. L. & GONZAGA, V. Procedimentos e Métodos utilizados em Quarentena de germoplasma Vegetal. EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia, Série Documentos, N° 103, 1-33. 2003.

MARINHO, V.L.A. & BATISTA, M.F. Interceptação, pelo serviço de quarentena, de vírus em mudas meristemáticas de bananeiras importadas. *Fitopatologia Brasileira*, 30: 552. 2005.

SALAZAR, L. F. (1982). Virus detection in potato seed production. Technical Information Bulletin 18. Centro Internacional de la Papa, Lima (PE).

**Comunicado
Técnico, 172**

**Ministério da
Agricultura,
Pecuária
e
Abastecimento**

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia Serviço de Atendimento ao Cidadão Parque Estação Biológica, Av. W/5 Norte (Final) – Brasília, DF CEP 70770-900 – Caixa Postal 02372 PABX: (61) 3448-4673 Fax: (61) 3340-3624 <http://www.cenargen.embrapa.br> e.mail:sac@cenargen.embrapa.br

1ª edição
1ª impressão (2007):

Ministério da Agricultura,
Pecuária e Abastecimento



**Comitê de
Publicações**

Presidente: Sergio Mauro Folle
Secretário-Executivo: *Maria da Graça Simões Pires Negrão*

Membros: Arthur da Silva Mariante
Maria da Graça S. P. Negrão
Maria de Fátima Batista
Maurício Machain Franco
Regina Maria Dechechi Carneiro
Sueli Correa Marques de Mello
Vera Tavares de Campos Carneiro

Expediente

Supervisor editorial: *Maria da Graça S. P. Negrão*
Normalização Bibliográfica: *Maria Iara Pereira Machado*
Editoração eletrônica: *Daniele Alves Loiola*