

Diagnose precisa

Hortalças são atacadas por doenças de origem viral como vira-cabeça do tomateiro, causada por TSWV. Conhecer os procedimentos de campo e laboratoriais realizados para se diagnosticar corretamente estas viroses é uma ferramenta poderosa para que se adotem as medidas adequadas de manejo

Alice Nagata



A diagnose correta é essencial para se controlar qualquer doença. No entanto, para cada doença, os métodos adotados são dife-

rentes. As viroses são causadas por vírus, agentes infecciosos formados por um tipo de ácido nucleico (RNA ou DNA), coberto por uma capa proteica. Todos

são parasitas obrigatórios e submicroscópicos, portanto, encontrados dentro de células causando as doenças e somente visíveis em microscópio eletrônico (maior

umento que um microscópio ótico). Essas características dificultam muito a diagnose. O procedimento inicia-se com a observação dos sintomas nas diferentes partes da planta, de partículas virais em microscópio e a distribuição das plantas doentes no campo e segue com a realização de testes específicos que podem ser divididos em biológico, sorológico e molecular (Figura 1).

AVALIAÇÃO DE SINTOMAS

A avaliação de sintomas no campo é a primeira etapa para a diagnose de doenças em plantas. Os vírus induzem diferentes sintomas nas plantas infectadas (veja exemplos de plantas com sintomas na Figura 2), principalmente a mudança na coloração de partes de folha, caule e fruto: clorose (leve perda da cor verde), manchas cloróticas, amarelecimento, bronzeamento (escurecimento do tecido), mosaico, manchas anelares e clareamento ou escurecimento de nervuras. Alguns vírus podem causar tumores, necroses (tecido morre e adquire coloração marrom), redução do crescimento da planta, bolhosidade, enrolamento foliar, enrugamento, deformação e paralisação de crescimento. As infecções também podem ser assintomáticas, isto é, os vírus não causam qualquer sintoma nas plantas, apesar de estarem presentes e multiplicarem no tecido infectado. Os sintomas podem ser locais (no ponto de inoculação), restritos aos sítios de infecção, ou sistêmicos (distribuídos por toda a planta). Os danos são diretos, tornando o produto impróprio para a comercialização (por exemplo, mosaico em folhas ou deformação em frutos) ou indiretos, com a diminuição do tamanho, qualidade e produtividade.

Contudo, a diagnose de doenças não deve ser baseada exclusivamente em critérios visuais, pois os sintomas variam de acordo com a espécie, cultivar, idade da planta hospedeira, época de infecção e condições ambientais. Além disso, infecções mistas, envolvendo mais de uma espécie viral (ou outros patógenos), são frequentes, tornando o diagnóstico

mais complexo. Fatores diversos como a carência ou o excesso de nutrientes, o ataque de insetos-praga ou de outros agentes fitopatogênicos e a toxicidade de herbicidas também podem desencadear sintomas semelhantes àqueles induzidos pelos vírus. Dessa forma, o uso de técnicas diagnósticas adicionais é indispensável.

COLETA DE AMOSTRAS PARA ANÁLISE

Para a análise de viroses, é importante que a planta esteja fresca para possibilitar a avaliação de sintomas. Em geral, folhas e brotos apicais são as partes mais adequadas para a realização dos testes. As coletas devem ser efetuadas em plantas com sintomas diversos e também em vegetais sem sintomas. Cada material coletado (folha, talo, fruto) deve ser envolto em papel absorvente e embalado em saco plástico. Plantas com sintomas semelhantes devem ser acondicionadas de forma agrupada. Caso a planta desfolhe com rapidez, é importante colocar cada amostra em uma embalagem diferente. Recomenda-se também anotar o número de amostras, os sintomas principais, a cultivar, a idade das plantas, o local e a data de coleta, o nome do proprietário da lavoura e do coletor das amostras e qualquer outra informação relevante. Por último, enviar

as amostras a um laboratório de diagnose por via expressa.

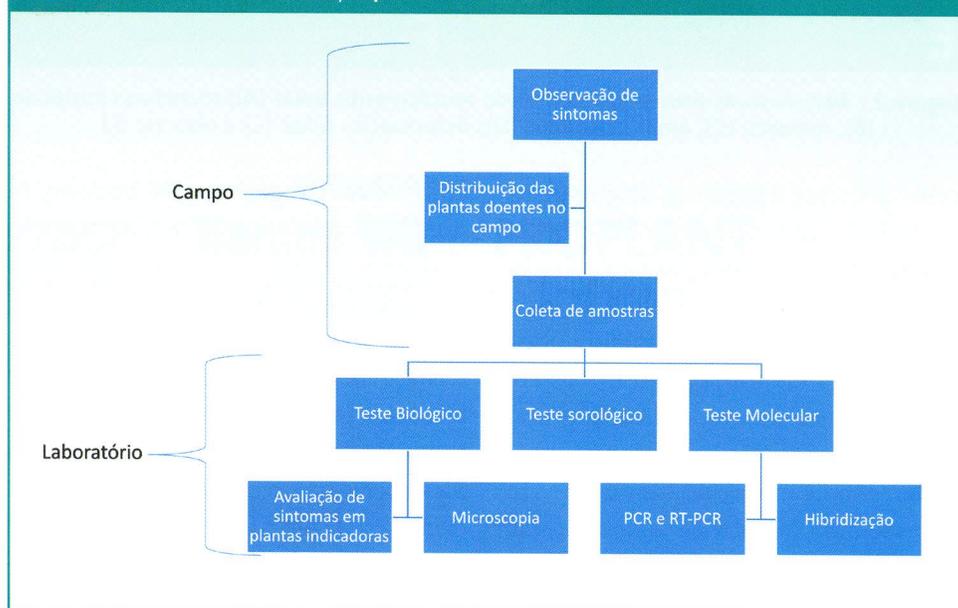
MICROSCOPIA ELETRÔNICA

A microscopia eletrônica permite a observação de partículas virais, servindo de auxílio na diagnose de doenças de causa viral. Estruturas de outros fitopatógenos, como fungos e bactérias, podem ser visualizadas através de ferramentas simples, como lupas e microscópios óticos. Já para a visualização de vírus é necessário utilizar microscópios eletrônicos com alto poder de resolução. Entretanto, a análise da morfologia das partículas não permite a identificação do vírus em nível de espécie. Para a confirmação da espécie é indispensável o emprego de outras ferramentas de diagnose. A desvantagem da técnica para ser usada rotineiramente na diagnose é o alto custo do equipamento e da sua manutenção e a necessidade de mão de obra especializada.

TESTE BIOLÓGICO

A partir da primeira análise dos sintomas na planta, listam-se os possíveis vírus que podem estar relacionados com a doença e inicia-se o teste de inoculação artificial em plantas-teste, também chamadas de indicadoras. As plantas reagem de

Figura 1 - Diferentes procedimentos para identificação de fitoviroses. Para um diagnóstico preciso, a utilização de mais de um método de identificação pode ser necessária



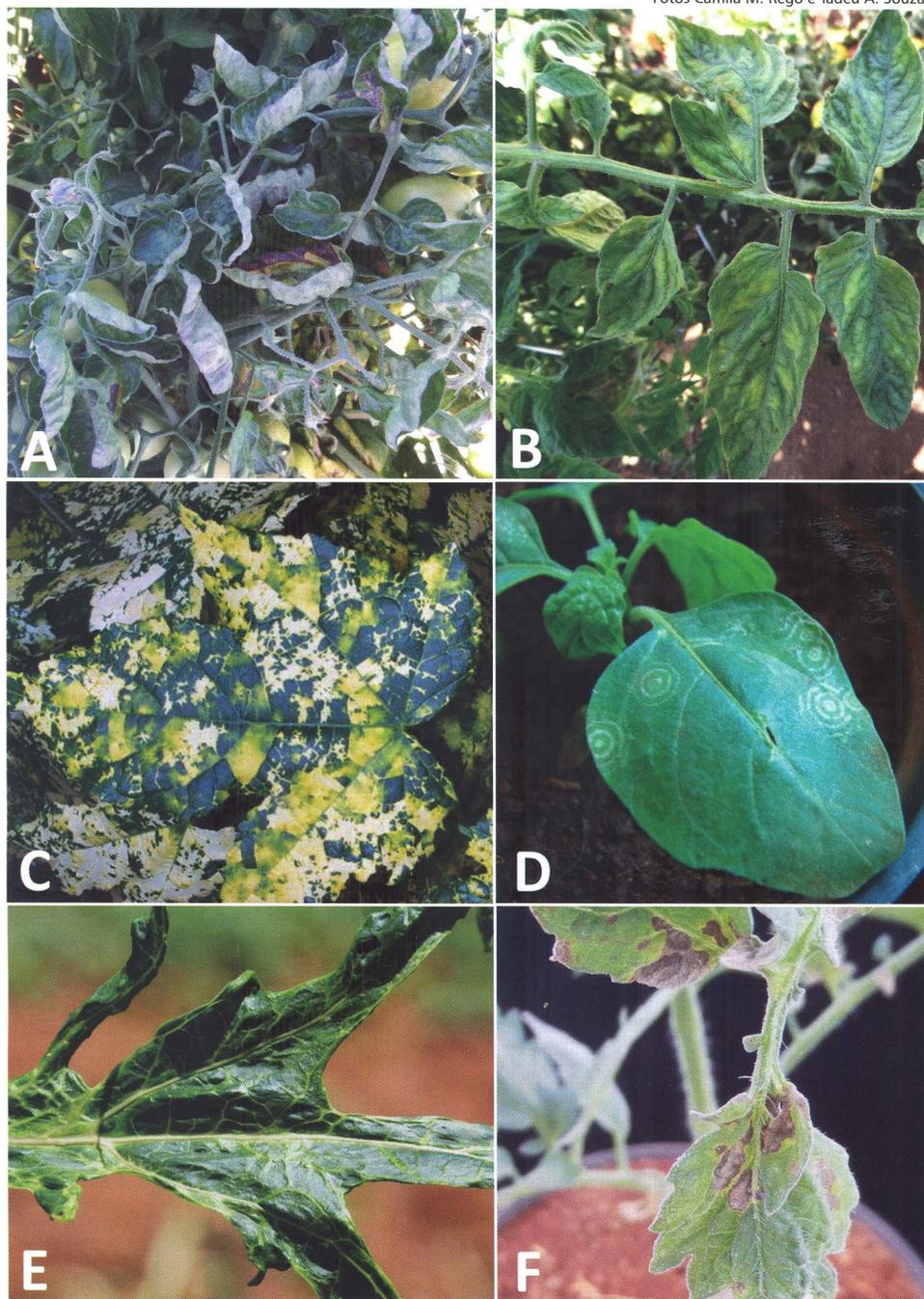


Figura 2 - Sintomas de viroses apresentando enrolamento foliar (A); manchas cloróticas (B); mosaico (C); anéis cloróticos (D); deformação foliar (E) e necrose (F)

forma diferente à presença do patógeno, produzindo sintomas distintos, porém, característicos da infecção viral. Assim, a observação do tipo de sintoma produzido em cada planta indicadora pode possibilitar a identificação do vírus em questão ou, ao menos, indicar o grupo ao qual pertence. Algumas das principais espécies indicadoras de fitoviroses são *Chenopodium quinoa*, *C. amaranticolor*, *Datura stramonium*, *D. metel*, *Gomphrena globosa*, *Solanum lycopersicum*, *Nicotiana*

benthamiana, *N. glutinosa*, *N. tabacum*, *N. rustica*, *Cucurbita pepo*, *Capsicum annuum*, *C. chinense*, *Ipomoea setosa*, *Physalis pubescens* e *Nicandra physaloides*.

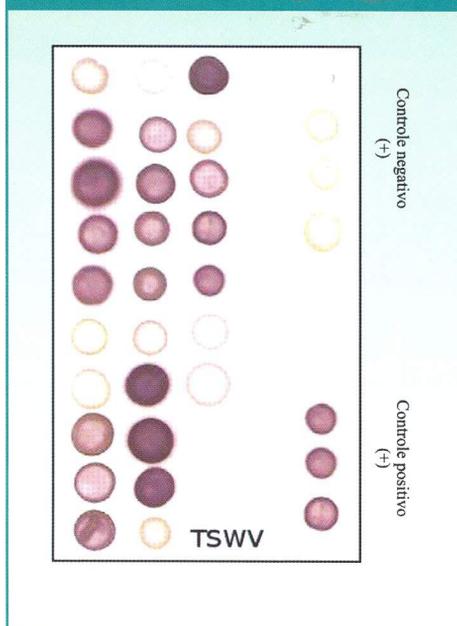
A transmissão do vírus para as plantas-teste ocorre, em geral, por inoculação mecânica. Materiais vegetais infectados são triturados em uma solução com pH neutro a levemente básico e o extrato obtido é friccionado na superfície das folhas das plantas previamente polvilhadas com agentes abrasivos, que provocam pequenos ferimentos

no limbo foliar, possibilitando a penetração do vírus no tecido vegetal. Algumas espécies virais, no entanto, não são transmitidas mecanicamente, sendo a inoculação realizada por enxertia ou com o vetor (inseto ou outro organismo transmissor) adequado. Em todos os casos, estes procedimentos devem ser feitos em ambiente fechado, como em uma casa de vegetação, para garantir a ausência de outros patógenos e pragas. Embora nem sempre os sintomas resultantes sejam suficientes para a diagnose precisa da doença, o teste biológico com plantas indicadoras é uma ferramenta complementar relevante ao diagnóstico. O teste é de baixo custo, porém, requer que as plantas indicadoras sejam preparadas com antecedência e o resultado é demorado, pois exige que os sintomas tornem-se visíveis para a sua análise.

TESTE SOROLÓGICO

Os testes sorológicos baseiam-se na detecção de vírus utilizando anticorpos, sendo ferramentas rápidas e precisas de diagnose para a maioria das doenças virais. Os testes sorológicos são utilizados para detectar as

Figura 3 - Resultado da detecção viral de *Tomato spotted wilt virus* (TSWV, agente causal do vira-cabeça do tomateiro) em membrana de nitrocelulose. Cada ponto na membrana representa uma amostra avaliada. Os pontos escuros (roxos) correspondem às reações positivas e indicam a presença de TSWV no tecido da planta amostrada. Amostras sem vírus são visualizadas nos pontos claros



proteínas virais através de anticorpos específicos. Os anticorpos são proteínas que resultam de uma resposta imunológica de um animal à presença de um determinado agente estranho (vírus ou bactéria, por exemplo), sendo a reação altamente específica. Partículas virais são injetadas no animal (por exemplo, coelho, rato, galinha ou cabra). O sistema imunológico passa a produzir anticorpos específicos contra as proteínas virais. Os anticorpos produzidos são coletados e utilizados na detecção de vírus.

Para a realização do teste, o extrato foliar a ser investigado com possível infecção viral é colocado em contato com o anticorpo específico para que ocorra a ligação entre o vírus e o anticorpo. Essa ligação específica é visualizada através de uma reação enzimática (mudança de coloração ou emissão de fluorescência), confirmando a presença de partículas virais. O teste pode ser realizado em membrana de nitrocelulose (Figura 3) ou em placa de plástico. Os métodos

sorológicos proporcionam a avaliação de um grande número de amostras, de forma rápida, eficiente e com alta sensibilidade, o que o torna o método padrão para a diagnose de vírus vegetais.

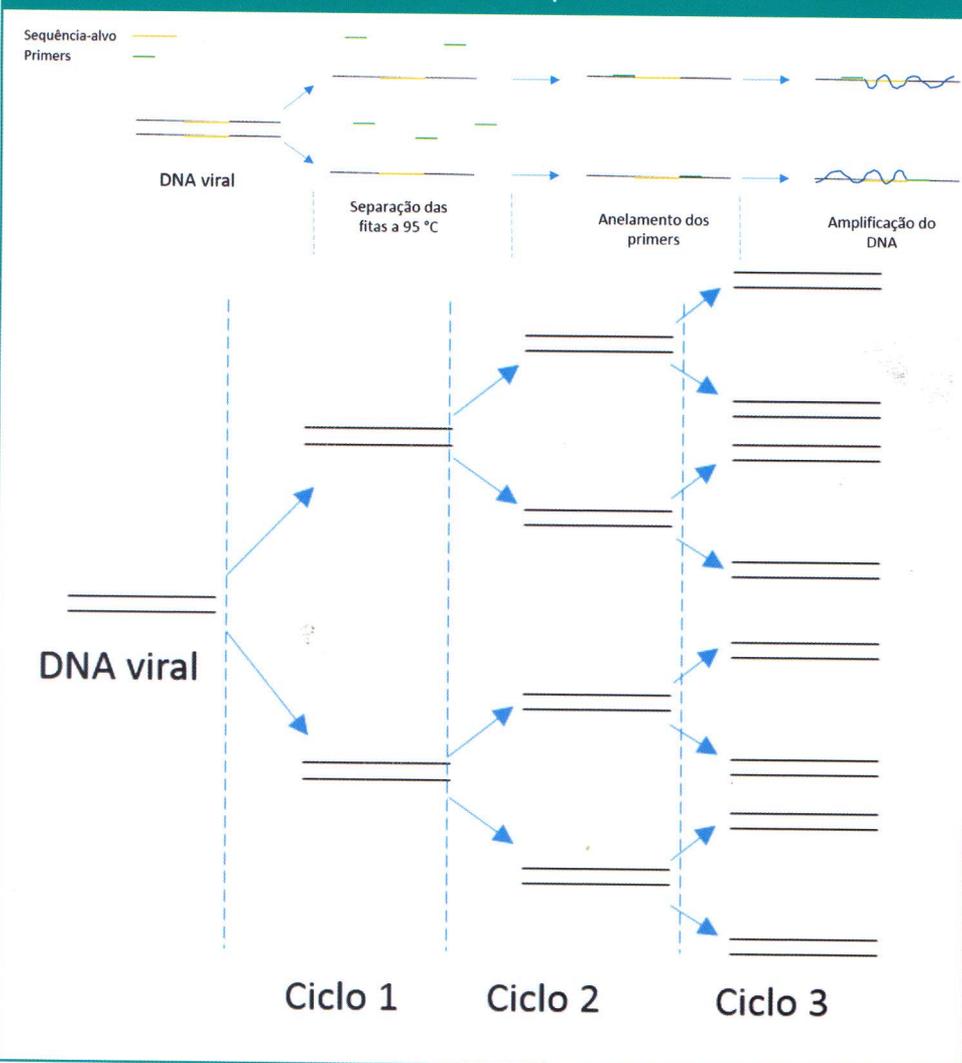
TESTES MOLECULARES

Diferentes espécies de vírus fitopatogênicos são rotineiramente identificadas por meio de técnicas moleculares, capazes de detectar a presença do material genético viral (DNA, como em begomovírus ou RNA, como em tospovírus) em amostras infectadas. As duas técnicas mais usadas são a reação em cadeia da polimerase (mais conhecida como PCR, na sigla em inglês) e a hibridização. APCR pode gerar milhares de cópias de um fragmento de DNA a partir de uma única molécula de DNA. Esse processo ocorre por meio de ciclos, cada um contendo três etapas. A reação começa com a separação das fitas duplas de DNA por aumento de temperatura para cerca de 95°C (etapa

de desnaturação). A seguir, a temperatura é decrescida para 48°C-55°C, permitindo que duas pequenas sequências de DNA, os primers (ou oligonucleotídeos) reconheçam regiões específicas do DNA viral a ser detectado e liguem-se a estas regiões (etapa de anelamento). Os primers funcionam como iniciadores para a síntese de uma nova fita de DNA, formada pela ação da enzima DNA polimerase termorresistente na última etapa, que ocorre tipicamente a 72°C, temperatura ótima para a ação desta enzima (etapa de amplificação ou extensão) (Figura 4A). Estas etapas são repetidas dezenas de vezes, gerando uma grande quantidade do DNA viral a ser detectado (Figura 4B). A presença do vírus na amostra é confirmada pela visualização do DNA amplificado por eletroforese em gel de agarose (Figura 5).

Para a detecção de vírus de RNA (como tospovírus, o causador da doença vira-cabeça), uma reação anterior à PCR precisa ser realizada, a transcrição reversa (RT-PCR,

Figura 4 - A reação em cadeia da polimerase (PCR) é capaz de gerar várias cópias de DNA viral, permitindo análises posteriores. A) Um ciclo de PCR envolve uma etapa de desnaturação do DNA em uma amostra, seguida por uma etapa de anelamento dos primers, que reconhecem sequências específicas do DNA viral, e uma etapa final de extensão pela ação de uma DNA polimerase termorresistente. B) O ciclo da PCR é repetido por dezenas de vezes, amplificando o DNA viral exponencialmente a cada ciclo



do inglês reverse transcription – polymerase chain reaction). Nessa técnica, inicialmente ocorre a síntese de DNA a partir de uma fita molde do RNA viral, pela ação da enzima transcriptase reversa. Em seguida, a molécula de DNA gerada é amplificada por PCR. Atualmente, existem primers específicos para a detecção da maioria das espécies virais de DNA e RNA que infectam plantas no Brasil, como begomovírus, tospovírus e crinivírus.

A PCR é uma técnica relativamente rápida e sensível para a detecção de vírus, tanto de DNA quanto de RNA. Entretanto, os equipamentos e a estrutura necessários são dispendiosos e necessitam de mão de obra qualificada. Além disso, é necessário que

o pesquisador faça uma boa avaliação dos sintomas na planta, uma vez que é possível testar a presença de somente um grupo viral por reação.

HIBRIDIZAÇÃO

A hibridização é uma técnica de detecção baseada na alta especificidade entre ácidos nucleicos e suas sequências complementares (DNA:DNA, RNA:RNA, DNA:RNA). Inicialmente, uma amostra contendo ácido nucleico viral, normalmente o DNA (ou RNA) total extraído de uma planta infectada, é fixada em uma membrana, que serve como um suporte sólido. Posteriormente, uma sonda de DNA ou RNA, complementar a uma sequência viral conhecida, é adicionada.

Para detecção do vírus, a sonda é marcada com moléculas repórteres que permitem a sua visualização (por exemplo, emitem fluorescência). A emissão de fluorescência indica, portanto, que a amostra é positiva, isto é, a planta está infectada com o vírus em análise. Uma das grandes vantagens desta técnica é que o preparo das amostras é relativamente simples, possibilitando o uso de extratos brutos, e a sensibilidade é alta, sendo superior ao teste sorológico.

Para a maioria das viroses a realização de um ou dois testes pode ser suficiente para uma diagnose correta, porém, em alguns casos um conjunto de vários testes é necessário. Análises complementares como a identificação do vetor auxiliam em muito a diagnose. Como os vírus são altamente variáveis, as respostas aos testes também podem ser variadas, dificultando a conclusão final dos testes diagnósticos. São poucos os laboratórios que realizam testes diagnósticos para viroses, como, por exemplo, as unidades da Embrapa, universidades e laboratórios particulares.

Erich Yukio Tempel Nakasu,
Embrapa Hortaliças
Camila de Moraes Rêgo,
Tadeu de Araujo Souza e
Alice Kazuko Inoue-Nagata,
Embrapa Hortaliças e
Universidade de Brasília

Figura 5 - Gel de agarose de DNA amplificado por PCR com primers específicos corado com brometo de etídeo. 1) Marcador molecular; 2 e 3) ausência de amplificação de DNA de amostras negativas para a presença de vírus; 4 e 5) presença de DNA de tamanho esperado em amostras positivas para um vírus

