



ISSN 0102 - 0110

Agosto, 2003

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Centro Nacional de Pesquisa de Recursos Genéticos e Biotecnologia
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

Documentos 103

Procedimentos e Métodos Utilizados no Intercâmbio e Quarentena de Germoplasma Vegetal

Vera Lúcia de Almeida Marinho
Marta Aguiar Sabo Mendes
Renata Cesar Vilardi Tenente
Maria Fátima Batista
Maria Regina Vilarinho de Oliveira
Abi Soares dos Anjos Marques
Araílde Fontes Urben
José Nelson Lemos Fonseca
Vilmar Gonzaga

Brasília, DF
Agosto, 2003

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa - Recursos Genéticos e Biotecnologia

Serviço de Atendimento ao Cidadão
Parque Estação Biológica, Av. W5 Norte (Final) - Brasília, DF
CEP 70770-900 - Caixa Postal 02372
PABX: (61) 448-4600
Fax: (61) 340-3624
<http://www.cenargen.embrapa.br>
e.mail:sac@cenargen.embrapa.br

Comitê de Publicações da Unidade

Presidente: José Manuel Cabral de Sousa Dias
Secretária-Executiva: Maria José de Oliveira Duarte

Membros: Luciano Lourenço Nass
Regina Maria Dechechi G. Carneiro
Maurício Machaim Franco
Sueli Correa Marques de Mello
Vera Tavares Campos Carneiro

Suplentes: Maria Alice Bianchi
Maria Fátima Batista

Supervisor Editorial: Maria José de Oliveira Duarte
Normalização Bibliográfica: Maria Alice Bianchi
Tratamento de Ilustrações: Giscard Matos de Queiroz
Editoração Eletrônica: Giscard Matos de Queiroz
1ª edição
1ª impressão (2003): tiragem 150

Todos os direitos reservados.

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

Procedimentos e métodos utilizados no intercâmbio e quarentena de germoplasma vegetal/ Vera Lúcia de Almeida Marinho... [et al.]. — Brasília : Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2003. 4Op. — (Documentos / Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, ISSN 0102 – 0110 ; n. 103).

1. Germoplasma vegetal - Intercâmbio. 2. Germoplasma vegetal – Análise fitossanitária - Metodologia. 3. I. Marinho, Vera Lúcia de Almeida. II. Série.

333.9534 - CDD 21

© Embrapa 2003

Autores

Vera Lúcia de Almeida Marinho

Bióloga, Doutora, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Caixa Postal 02372, CEP 70849-970. E.mail: vmarinho@cenargen.embrapa.br

Marta Aguiar Sabo Mendes

Eng. Agron., Mestre, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Caixa Postal 02372, CEP 70849-970. E.mail: martamen@cenargen.embrapa.br

Renata Cesar Vilardi Tenente

Eng. Agron., Doutor, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Caixa Postal 02372, CEP 70849-970. E.mail: renata@cenargen.embrapa.br

Maria Fátima Batista

Eng. Agron., Doutor, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Caixa Postal 02372, CEP 70849-970. E.mail: fatima@cenargen.embrapa.br

Maria Regina Vilarinho de Oliveira

Bióloga, Doutora, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Caixa Postal 02372, CEP 70849-970. E.mail: vilarin@cenargen.embrapa.br

Abi Soares dos Anjos Marques

Eng. Agron., Doutor, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Caixa Postal 02372, CEP 70849-970. E.mail: amarques@cenargen.embrapa.br

Araíde Fontes Urban

Bióloga, Doutora, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Caixa Postal 02372, CEP 70849-970. E.mail: arailde@cenargen.embrapa.br

José Nelson Lemos Fonseca

Eng. Agron., Bacharel, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Caixa Postal 02372, CEP 70849-970. E.mail: jnelson@cenargen.embrapa.br

Vilmar Gonzaga

Eng. Agron., Mestre, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Caixa Postal 02372, CEP 70849-970. E.mail: vgonzaga@cenargen.embrapa.br

Sumário

Resumo	7
Abstract	9
1. Introdução	11
2. Legislação Fitossanitária	11
3. Intercâmbio de Germoplasma Vegetal	13
4. Quarentena de Germoplasma Vegetal	16
4.1 Unidade de Entomologia e Acarologia	17
4.2 Unidade de Micologia	20
4.3 Unidade de Virologia	24
4.4 Unidade de Nematologia	30
4.5 Unidade de Bacteriologia	34
5. Referências Bibliográficas	36

Procedimentos e Métodos Utilizados no Intercâmbio e Quarentena de Germoplasma Vegetal

Resumo

O intercâmbio de germoplasma vegetal, no Brasil, é uma atividade indispensável para o enriquecimento do patrimônio genético, gerando novas variedades que incrementam a agricultura nacional. Este intercâmbio abrange a introdução, a exportação e o trânsito interno de germoplasma vegetal, atendendo a um grande número de usuários no Brasil e no exterior. Embora seja uma atividade importante, este intercâmbio de material vegetal, pode trazer e/ou disseminar pragas exóticas ou de importância econômica para o país, causando sérios danos para a agricultura. Para minimizar o risco de introdução dessas pragas, foram estabelecidos procedimentos e métodos para o intercâmbio e quarentena de germoplasma vegetal. Este trabalho tem como objetivo descrever os procedimentos para o intercâmbio seguro de germoplasma, assim como os métodos utilizados nas análises fitossanitárias realizadas nas cinco Unidades que compõem o Laboratório de Quarentena da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia – a saber: Bacteriologia, Entomologia, Micologia, Nematologia e Virologia.

Procedimentos e Métodos Utilizados no Intercâmbio e Quarentena de Germoplasma Vegetal

Abstract

In Brazil, the exchange of plant germplasm is an indispensable activity for the improvement of genetic resources, generating new varieties that contribute to our national agriculture. This exchange includes the introduction, exportation and internal distribution of plant material, serving a great number of users in Brazil and abroad. Although it is an important activity, this exchange of plant material can carry and/or disseminate exotic or economically important pests, causing severe damage to our agriculture. To minimize the risk of pest introduction, procedures and methods were established for the exchange and quarantine of plant germplasm. This work has the objective of describing the procedures for the safe exchange of germplasm, as well as the methods used for phytosanitary analyses by the five units that comprise the Quarantine Laboratory of Embrapa Genetic Resources and Biotechnology – Bacteriology, Entomology, Mycology, Nematology and Virology.

I. Introdução

A maioria dos produtos que fazem parte da alimentação dos brasileiros, como o arroz, o feijão, o trigo e o milho são de origem exótica, embora o Brasil seja o país detentor da maior biodiversidade do mundo (cerca de 20%). A introdução de germoplasma vegetal no país é um processo dinâmico utilizado para se obter variedades mais produtivas, resistentes a pragas e adaptadas às nossas condições edafoclimáticas. Esta atividade permitiu que, nas últimas décadas, o país passasse da condição de importador para exportador de diversos produtos, como por exemplo soja, milho, ervilha, noz-moscada, canela, pimenta-do-reino, forrageiras, espécies florestais, frutíferas e hortaliças. No entanto, a introdução não controlada desse germoplasma vegetal, pode acarretar a entrada de pragas no país. No Brasil, são inúmeros os exemplos de introdução de pragas exóticas que provocaram, e em alguns casos ainda provocam, sérios danos à agricultura. Podemos citar como exemplo o caso da introdução do fungo *Diaporthe phaseolorum* (Cke. & Ell) Sacc. f. sp. *meridionalis* Morgan-Jones, agente causal do cancro-da-haste da soja. Este fungo, identificado pela primeira vez em 1989, causou sérios danos à cultura da soja, com perdas estimadas em até 100%. Atualmente essa doença está parcialmente controlada graças ao desenvolvimento de variedades resistentes. O mesmo não aconteceu com o nematóide do cisto da soja, *Heterodera glycines* Ichinohe, introduzido no país em 1992, e que até hoje representa uma ameaça para a cultura da soja. Outro exemplo recente de introdução de praga exótica no Brasil é a do fungo *Mycosphaerella fijiensis*. Em 1998, uma severa epidemia de "Sigatoka negra", causada por essa espécie de fungo, foi constatada em diversas cultivares de banana, no estado do Amazonas. Esta doença é responsável por perdas de até 100% da cultura na ausência de medidas de controle (Cordeiro *et al.*, 1998).

Para assegurar um movimento seguro de plantas, a introdução de germoplasma vegetal deve se basear numa regulamentação fitossanitária eficaz para minimizar o risco da introdução de pragas exóticas no país.

2. Legislação Fitosanitária

A primeira lei relativa à quarentena de plantas foi promulgada na França em 1660, mas somente em 1881 o primeiro acordo internacional sobre fitossanidade foi firmado na Europa, com a finalidade de prevenir a introdução de

Phylloxera vitifoliae (Hemiptera: Phylloxeridae) em videira. No Brasil, o início das atividades dos serviços oficiais fitossanitários data de 1909, quando foi criado o “Serviço de Inspeção, de Estatística e de Defesa Agrícola”. Mas somente em 1934 o “Regulamento de Defesa Sanitária Vegetal” foi publicado no Diário Oficial (Decreto Nº 24.114 de 12 de abril). Este Regulamento ainda está em vigor nos dias de hoje e ampliou largamente as atribuições desse serviço.

Em maio de 1977, a Portaria Nº 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 MAPA como Estação Quarentenária nível 1 (*Estação quarentenária com capacidade de detectar e identificar pragas quarentenárias em nível de espécie e que dispõe de instalações adequadas e especialistas renomados nas áreas de virologia, acarologia, nematologia, micologia, bacteriologia, entomologia e plantas invasoras – Portaria Nº 214, Instrução Normativa Nº 16, de 29/12/1999*).

A Portaria Nº 437, de 25 de novembro de 1985, estabelece normas para processamento das importações de sementes e mudas. Neste caso o pedido é formulado à Delegacia Federal de Agricultura (DFA) do Estado correspondente que, quando necessário, solicita parecer técnico sobre a importação do material a alguma instituição credenciada. Os demais procedimentos são estabelecidos pelo Departamento de Defesa e Inspeção Vegetal (DDIV) que prescreve as medidas de quarentena acompanhadas e fiscalizadas pela DFA do Estado até a liberação do material. Recentemente, o intercâmbio e os procedimentos quarentenários de vegetais e solo para pesquisa e outros fins científicos foram normatizados pela Instrução Normativa Nº 1, do MAPA, publicada no Diário Oficial em 15 de dezembro de 1998.

No que se refere à exportação de vegetais para o comércio, as normas para processamento das importações de sementes e mudas estão estabelecidas na Portaria No 93 de 14 de abril de 1982.

No âmbito internacional, o Brasil é signatário da “Convenção Internacional de Proteção de Vegetais” realizada em 1951 em Roma pela FAO e atualizada em 1997 durante 29ª sessão da Convenção. Esta Convenção estipula que os

governos devem cooperar entre si através de organizações regionais de proteção dos vegetais. Para isso, os países se organizaram em grupos geograficamente próximos para conceber e colocar em prática medidas fitossanitárias de quarentena de plantas no que concerne ao comércio e à pesquisa. As primeiras organizações regionais criadas com esse objetivo foram a “European and Mediterranean Plant Protection Organization” (EPPO), formada pelos países da Comunidade Européia, e a “North American Plant Protection Organization” (NAPPO), cujos países membros são os Estados Unidos, o Canadá e o México.

Em 1989, o Brasil, a Argentina, o Paraguai e o Uruguai – países componentes do MERCOSUL – e o Chile constituíram o “Comite de Sanidad Vegetal del Cono Sur” (COSAVE) com o objetivo de estabelecer regulamentos fitossanitários para o intercâmbio seguro de material vegetal entre esses países. Os acordos comerciais entre esses países e a Organização Mundial do Comércio (OMC) garantem a livre circulação de bens, mas exigem uma nova política fitossanitária baseada em uma análise precisa dos riscos de entrada de pragas e não na proibição geral da entrada de alguns produtos vegetais. O intercâmbio de produtos vegetais entre os países do MERCOSUL é submetido a regulamentações específicas aprovadas pelo COSAVE.

3. Intercâmbio de Germoplasma Vegetal

A EMBRAPA coordena o Sistema Nacional de Pesquisa Agropecuária (SNPA), que inclui as Unidades da Embrapa, as Universidades e as empresas estaduais de pesquisa. Os pedidos de importação de germoplasma das Unidades da Embrapa devem ser encaminhados diretamente ao Cenargen/Laboratório de Quarentena Vegetal (LQV), que toma as providências cabíveis junto ao Departamento de Defesa e Inspeção Vegetal (DDIV), do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Os requerimentos de importação de germoplasma dos demais órgãos de pesquisa deverão ser enviados diretamente à DFA do Estado correspondente, que o encaminhará ao DDIV e este solicitará um parecer técnico do Cenargen antes de emitir a “Permissão de Importação”. Os procedimentos posteriores à chegada do germoplasma ao País cabem à DFA e a quarentena é realizada pelo Cenargen ou por outro órgão de quarentena credenciado pelo MAPA.

Os pedidos de importação de organismos para controle biológico e outros afins, destinados à pesquisa das Unidades da Embrapa, devem ser enviados à Embrapa Meio Ambiente que, por sua vez, os encaminhará ao DDIV/MAPA para obter a permissão de importação.

O MAPA é o órgão fiscalizador da introdução de vegetais junto às alfândegas de portos, aeroportos e correios. Cada estado possui um representante oficial do MAPA na DFA, juntamente com o Ministério da Fazenda (Alfândega da Receita Federal).

Para a importação de produtos vegetais para pesquisa, a única exigência requerida do fornecedor do material é o Certificado Fitossanitário expedido pelo país exportador. Quando concedida a Permissão de Importação pelo DDIV, o Cenargen envia à instituição doadora o pedido de solicitação do material juntamente com a etiqueta de importação. O material – ao chegar ao aeroporto, porto ou correio – é inspecionado pelo inspetor da DFA, que examina as suas condições sanitárias e a documentação e prescreve a quarentena de pós-entrada em alguma instituição credenciada pelo MAPA.

Desde 1976, o Cenargen vem realizando o intercâmbio e a quarentena do germoplasma destinado à pesquisa, tendo sido intercambiados até dezembro de 2002 um total de 410.421 acessos de germoplasma, 292.172 de importação, 50.284 de exportação e 67.965 acessos referentes ao trânsito interno (Tabela 1).

Dentre os produtos mais intercambiados neste período, podemos citar: milho, trigo, arroz, hortaliças, soja e feijão e entre as instituições internacionais que mais enviaram germoplasma para o Brasil destacam-se: CIMMYT (México, Uruguai e Colômbia), CIAT (Colômbia), USDA (Estados Unidos), CIP (Peru), IRRI (Filipinas) e CSIRO (Austrália). No Brasil, algumas das instituições que mais receberam germoplasma do exterior foram: Embrapa, IAPAR, EPAGRI, UNESP e ESALQ.

No Cenargen, todas as informações sobre o germoplasma recebido, são conferidas, pelo curador dos respectivos produtos e registradas no Sistema Brasileiro de Informação de Recursos Genéticos (SIBRARGEN).

Tabela 1. Número de acessos de germoplasma vegetal intercambiados pela Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia no período de janeiro de 1976 a dezembro de 2002.

Ano	Importação	Exportação	Trânsito Interno	Total
1976	1.670	308	4.047	6.025
1977	5.975	2.499	1.875	10.349
1978	1.185	633	1.269	3.087
1979	2.508	1.266	1.529	5.303
1980	8.675	2.045	1.651	12.371
1981	9.457	2.287	1.922	13.666
1982	3.696	1.230	2.943	7.869
1983	6.978	1.721	5.606	14.305
1984	23.554	1.503	4.175	29.232
1985	4.765	3.233	4.573	12.571
1986	18.048	3.514	2.696	24.258
1987	10.076	3.496	2.578	16.150
1988	11.070	2.519	4.262	17.851
1989	9.639	2.796	2.858	15.293
1990	10.145	2.492	1.188	13.825
1991	10.901	2.257	1.515	14.673
1992	22.218	4.167	1.496	27.881
1993	9.192	2.732	4.521	16.445
1994	9.388	1.264	439	11.091
1995	10.537	4.312	421	15.270
1996	16.185	1.599	524	18.308
1997	15.201	1.004	2.684	18.889
1998	23.405	334	3.269	27.018
1999	18.750	700	3.550	23.000
2000	13.596	357	5.232	19.185
2001	15.358	66	1.142	16.566
2002	33.444	448	267	34.159
Total	292.172	50.284	67.965	410.421

4. Quarentena de Germoplasma Vegetal

A palavra “Quarentena” é derivada do Latim “quadraginata” que significa quarenta. Em italiano, esta palavra foi originalmente aplicada para o período de 40 dias de isolamento requerido para que um navio, incluindo seus passageiros e carga, permanecesse ancorado em um porto de chegada quando proveniente de um país onde ocorressem doenças epidêmicas. Provavelmente, a primeira quarentena foi imposta em Veneza, Itália, em 1374, quando viajantes suspeitos de terem contraído a peste bubônica foram banidos. Quarentena vegetal, literalmente, significa o isolamento de plantas por 40 dias, período de incubação para o aparecimento e detecção de sintomas de doenças. Na verdade, este procedimento constitui apenas uma fração das diversas ações que são utilizadas em um programa de exclusão de organismos indesejáveis (Kahan, 1989).

As medidas de quarentena aplicadas aos produtos vegetais podem ser de exclusão ou de erradicação. Em caso de exclusão, os riscos de entrada dos agentes patogênicos são minimizados pelo controle da sua ausência no material vegetal antes da importação. Ao contrário, a erradicação autoriza a aplicação de tratamentos térmicos, químicos, biológicos ou de limpeza através de cultura de tecido quando o vegetal já está dentro do país importador.

Por definição, uma praga quarentenária é um organismo de risco econômico potencial para a área posta em perigo e onde ainda não está presente ou, se está, não se encontra amplamente distribuída e está oficialmente controlada. Considera-se praga quarentenária A1 aquela que não está presente no país ou na região. praga quarentenária A2 é aquela que apresenta distribuição limitada em uma área e está oficialmente controlada. Entende-se como área um país, parte de um país ou todas ou partes de vários países oficialmente definidos.

Para decidir quais espécies são de importância quarentenária, para o país ou região, várias informações devem ser consideradas. É necessário avaliar o potencial das espécies exóticas em causar prejuízos no país em questão. Esse processo é o componente preliminar da Análise de Risco de Pragas (ARP). O COSAVE preparou as listas de pragas quarentenárias A1 e A2 de acordo com regras de quarentena (publicado no “Diário Oficial do Brasil”, em 1996), que devem ser revisadas constantemente.

O Laboratório de Quarentena da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia analisa todo o germoplasma vegetal que entra no país para pesquisa. Esse procedimento visa minimizar a possibilidade de entrada de numerosas pragas de importância quarentenária e econômica para o país. Vários exemplos de interceptação de praga exótica para o Brasil podem ser citados, entre elas: o fungo *Tilletia indica* Mitra, agente do carvão parcial do trigo, o Banana Bunchy Top Virus (BBTV) e o nematóide parasita de batata *Globodera* sp, relacionados nas tabelas 2 a 6.

O problema do diagnóstico dos agentes fitopatogênicos recobre duas facetas complementares diferidas pelas exigências técnicas e organizacionais que implicam. A detecção de um agente patogênico, por exemplo, dentro do quadro de um procedimento de certificação ou de quarentena, exige prioritariamente que a sensibilidade da técnica adotada permita evidenciar uma infecção latente em plantas que não apresentam sintomas. A identificação requer a utilização de técnicas que apresentem níveis de especificidade suficientes para caracterizar o agente causal com uma precisão adaptada ao problema encontrado (espécie, patovar, biotipo, etc.).

Os progressos na área de biologia permitiram o aparecimento de inúmeras técnicas possibilitando a caracterização de moléculas imunogênicas (em particular as proteínas) ou a seqüências de ácidos nucléicos. Esses métodos abrem novas perspectivas dentro do diagnóstico de fitopatógenos e apresentam desenvolvimentos constantes.

O Laboratório de Quarentena Vegetal conta com cinco unidades de pesquisa especializadas: **Entomologia/Acarologia, Micologia, Virologia, Nematologia e Bacteriologia**. Cada unidade possui estrutura e metodologias próprias para detecção, identificação, caracterização e erradicação dessas pragas.

4.1- Unidade de Entomologia e Acarologia

Destina-se a detecção, identificação e erradicação de insetos e ácaros em todo germoplasma intercambiado.

O germoplasma vegetal é examinado diretamente no interior de armadilhas luminosas utilizando-se refletor e/ou microscópio estereoscópio para a detecção de insetos e/ou ácaros (sempre procurando por ovos, formas imaturas e/ou adultos no material) ou vestígios (perfurações, excreções ou teias). (Oliveira *et al.*, 1999).

Para detecção de espécies de ácaros, as sementes são mantidas em temperatura ambiente, peneiradas e os resíduos depositados em placa de Petri. Essa placa é colocada dentro de outra maior contendo álcool 70% para evitar o escape dos ácaros. Os resíduos do peneiramento das sementes são examinados ao microscópio estereoscópio (Navia *et al.*, 1999).

Também são procuradas sementes “contaminantes”, ou seja, sementes de plantas invasoras, que não fazem parte do material vegetal solicitado. Alguns dos insetos e ácaros detectados no período de 1976 a 2002 estão relacionados na Tabela 2.

Tratamento para controle e erradicação de Insetos e ácaros

- **Semente:** Todo germoplasma importado, exportado ou em trânsito no país sob a forma de sementes é fumigado com fosfeto de alumínio a 56% (fosfina) por um período de 72 horas quando a umidade relativa está acima de 50% e a temperatura no local acima de 20°C. Em ambientes, com temperatura e umidade relativa abaixo destes valores, o período de exposição é de 96 horas. O tratamento é realizado dentro de tambores e em sala hermeticamente fechados, com as embalagens das sementes perfuradas com estilete para facilitar a penetração do gás.

- **Material de propagação vegetativa:** Estacas, bulbos, rizomas e outras formas de propagação vegetativa intercambiados são submetidos a tratamento químico que consiste na imersão do material, por 15 minutos, em calda contendo inseticida e acaricida.

Preservação de insetos e ácaros

Insetos e ácaros detectados no material vegetal intercambiado são colocados em pequenos vidros contendo álcool 70%, com exceção dos microlepidopteros adultos, que são mantidos em envelope entomológico de papel manteiga com os

dados relativos ao material no qual o inseto foi detectado.

As formas imaturas de insetos e/ou ácaros vivas são incubadas em pequenas amostras do material vegetal na qual foram encontradas até que as mesmas atinjam o estágio adulto. Posteriormente, utiliza-se o mesmo procedimento de preservação correspondente ao adulto. Ácaros adultos e formas imaturas mortos são mantidos em lâmina utilizando solução de Hogel para posterior identificação.

Após a identificação dos organismos coletados, estes vão para a coleção de referência de insetos e ácaros da Quarentena Vegetal.

Tabela 2. Principais insetos e ácaros detectados em germoplasma vegetal importado.

Insetos / Ácaros	Produto	Procedência
<i>Acanthoscelides obtectus</i> (Say)	Feijão <i>Phaseolus vulgaris</i>	Argentina, Peru ; Colômbia
	Forrageiras <i>Leucaena diversifolia</i> <i>Calopogonium muconoides</i>	Colômbia
<i>Callosobruchus maculatus</i> (Boh.)	Caupi <i>(Vigna sinensis)</i>	Nigéria
<i>Zabrotes subfasciatus</i> (Boh.)	Caupi <i>(Vigna sinensis)</i>	Nigéria
<i>Anthomonus grandis</i> Boh.	Algodão <i>(Gossypium hirsutum)</i>	EUA
<i>Anthomonus grandis</i> Boh.	Trigo <i>(Triticum aestivum)</i>	França
<i>Sitophilus granarius</i> (L.)	Triticale <i>(Triticum aestivum x Secale cereale)</i>	EUA
	Trigo <i>Triticum aestivum</i>	Paraguai
<i>Sitophilus oryzae</i> (L.)	Arroz <i>(Oryza sativa)</i>	Colômbia, Filipinas ; Vietnam, Malásia ; Costa do Marfim

Continua ...

Continuação da Tabela 2 ...

Insetos / Ácaros	Produto	Procedência
<i>Hesperophanes</i> sp.	Madeira	Alemanha
<i>Tyrophagus</i> sp.	Cinamomo <i>Azadirachta indica</i>	Índia
<i>Euroglyphus</i> sp.	Forrageira (<i>Stylosanthes</i> sp.)	Austrália
<i>Cheyletus</i> sp.	Girassol (<i>Helianthus annuus</i>)	Argentina
<i>Schizotetranychus</i> sp.	Arroz <i>Oryza sativa</i>	Colômbia
<i>Tydeus tydeus</i> sp.	Ameixa <i>Prunus persica</i>	EUA
<i>Tydeus</i> sp.	Caqui <i>Diospyros kaki</i>	EUA

4.2. Unidade de Micologia

Esta unidade destina-se a detecção, identificação e erradicação de fungos fitopatogênicos em germoplasma vegetal importado; para tanto, utiliza várias metodologias de análise, de acordo com o tipo de material recebido.

Exame Direto: As amostras de sementes ou de material de propagação vegetativa (raízes, rizomas, bulbos, tubérculos e estacas) são examinadas diretamente sob microscópio estereoscópio. Por meio deste método pode-se observar descoloração do tecido, lesões necróticas e presença de estruturas fúngicas.

Lavagem e Sedimentação: Este método é utilizado para fungos que não se desenvolvem em meio de cultura ou que, quando se desenvolvem, não produzem esporos. São exemplos os fungos que causam carvão, ferrugem ou míldio. O método consiste na imersão das sementes em solução com Tween 20 a 0,02% seguida de agitação durante 10 minutos a 200 rpm com o objetivo de remover as estruturas fúngicas associadas às sementes. Em seguida, as sementes são retiradas e a suspensão é centrifugada durante 15 minutos a 2.500 rpm. O sobrenadante é descartado e o precipitado (esporos e/ou micélio de fungo) é examinado ao microscópio de luz (ISTA, 1976).

Métodos de incubação: **1.** Meio de Cultura : As sementes ou os fragmentos de material de propagação vegetativa são distribuídos em placas de Petri contendo meio de Batata-Dextrose-Ágar (BDA) ou outro meio de cultura específico. Após terem sido desinfetados superficialmente com hipoclorito de sódio a 0,2 % por 2 minutos e lavados por duas vezes em água destilada estéril. As placas são incubadas à temperatura de 25- 28 °C, sob luz fluorescente contínua, por 7-8 dias (ISTA, 1976; Tuite, 1969). **2.** Papel de Filtro: As sementes são colocadas em caixas plásticas tipo “gerbox” contendo duas folhas de papel de filtro umedecidas em solução de hipoclorito de sódio a 0,2 %. As sementes são incubadas em câmara com fotoperíodo de 12 horas de luz NUV (“Near Ultra Violet”) e 12 horas de escuro, durante 7-8 dias. Após este período, as sementes são examinadas sob microscópio estereoscópio para observação de estruturas fúngicas (ISTA, 1976).

Identificação de Fungos Fitopatogênicos : A identificação é realizada através de observações das características morfológicas e fisiológicas dos fungos sob microscópio estereoscópio e de luz. As principais referências utilizadas para as identificações dos fungos são: Barnett (1987), Ellis (1971), CMI Descript. (1964 a 1990), Ellis (1976), Hanlin (1990), IMI Descript. (1992 a 1998), Nelson et al. (1983), Silvanesan (1983), Silvanesan (1987), Sutton (1980). A confirmação da ocorrência no Brasil dos fungos identificados no germoplasma importado é feita através de consulta ao livro Fungos em Plantas no Brasil (Mendes et al., 1998) e a revistas especializadas sobre o assunto. Os principais fungos detectados pela unidade de micologia estão relatados na Tabela 3.

Teste de patogenicidade em quarentenário: São realizados testes de patogenicidade para fungos patogênicos de ocorrência no Brasil ou exóticos com o objetivo de verificar o grau de virulência ou de danos causados na planta hospedeira. A técnica consiste em fazer uma suspensão de 10^4 a 10^6 esporos/ml do fungo cultivado em meio de cultura BDA ou V8. Em seguida, a suspensão de esporos é inoculada em plântulas da mesma espécie vegetal da qual o fungo foi isolado e mantidas em câmara úmida até o surgimento dos sintomas. Procedese, então, o isolamento do fungo das lesões para confirmação da sua patogenicidade (Mendes & Ferreira, 1994).

Preservação e conservação de Fungos : **1.** Em tiras de papel de filtro: tiras de papel de filtro previamente esterilizadas (estufas 105 °C / 24h) são distribuídas sobre meio BDA, em placas de Petri, pouco antes de solidificar. Discos de

culturas fúngicas são transferidos para estas placas e incubados por mais ou menos 8 dias (dependendo do fungo) à 28°C, sob luz fluorescente contínua. As tiras de papel de filtro colonizadas pelo fungo são retiradas e transferidas para um dissecador contendo sílica gel, onde permanecem por 48h. Após este período, as tirinhas são guardadas em dissecador, em saquinhos de papel manteiga, previamente esterilizados. **2.** Em sílica gel (técnica modificada): os isolados dos fungos são cultivados em meio de cultura até obter boa esporulação. Prepara-se uma suspensão de esporos em uma solução de leite em pó desnatado a 10 %, esterilizado e resfriado a 4 °C. Recipientes (vidrinhos ou “ependorfs”) são preenchidos parcialmente com sílica gel incolor (35 a 70 meshes), previamente esterilizados com calor seco a 95°C/48 horas e mantidos sobre gelo picado para conservar a temperatura em torno de 4°C. A suspensão de esporos em leite é vertida nos recipientes, na proporção de 0,5 ml suspensão/ 4g de sílica, e conservada por mais 20 minutos a 4°C sobre o gelo seco. Para retirar a umidade do material, os recipientes são colocados em dissecador acoplado a uma bomba de vácuo por uma hora, à temperatura ambiente, durante 48 h. A verificação da viabilidade dos isolados é feita espalhando-se alguns cristais sobre meio de cultura. Se as culturas estiverem viáveis, os recipientes contendo os isolados devem ser armazenados em geladeira a 4 °C (Urban, 1994; Castro, et al., 1995).

Tratamento para controle/erradicação de Fungos em Germoplasma Vegetal

As sementes contaminadas com fungos exóticos ou de ocorrência localizada são tratadas quimicamente com fungicidas específicos de contato e/ou sistêmicos. Após o tratamento, a eficiência do mesmo é avaliada com a reanálise do material pelo método de “Blotter test” e estendendo-se o período de incubação para 21 dias. Pode-se também plantar as sementes tratadas em casa de vegetação e observar as plântulas quanto ao aparecimento de sintomas (ISTA, 1996). O material é enviado ao destinatário quando confirmada a erradicação da praga. Quando o tratamento químico não elimina a praga exótica, recomenda-se o emprego da técnica de cultura de tecidos. Neste caso, a eficiência do método na erradicação do patógeno é de 100%.

Tabela 3. Principais fungos detectados em germoplasma vegetal importado .

Fungos	Produtos	Procedência
<i>Colletotrichum capsici</i>	Pimentão (<i>Capsicum annuum</i>)	Taiwan
<i>Cytospora</i> sp.	Pinus (<i>Pinus</i> spp.)	Nicarágua
<i>Dreschlera australiensis</i>	Arroz (<i>Oryza sativa</i>)	Colômbia
<i>Dreschlera australiensis</i>	Centeio (<i>Secale cereale</i>)	Estados Unidos
<i>Dreschlera biseptata</i>	Trigo (<i>Triticum aestivum</i>)	Chile
<i>Dreschlera biseptata</i>	Triticale (<i>Triticum secale</i>)	Bulgária
<i>Dreschlera rostrata</i>	Arroz (<i>Oryza sativa</i>)	Colômbia
<i>Exserohilum monoceras</i>	Arroz (<i>Oryza sativa</i>)	Filipinas
<i>Glomerella</i> sp.	Feijão mungo-verde (<i>Vigna radiata</i>)	Tailândia
<i>Microascus dogueti</i>	Pinus (<i>Pinus</i> spp.)	Nicarágua
<i>Bipolaris euphorbiae</i>	Forageira (<i>Pennisetum</i> sp.)	França
<i>Phomopsis diospyri</i>	Caqui (<i>Diospyros kaki</i>)	Estados Unidos
<i>Sordaria fumicola</i>	Forageira (<i>Stylosanthes</i> sp.)	Austrália
<i>Tilletia controversa</i>	Trigo (<i>Triticum aestivum</i>)	Alemanha

Continua ...

Continuação da Tabela 3 ...

Fungos	Produtos	Procedência
<i>Tilletia indica</i>	Trigo (<i>Triticumaestivum</i>)	Uruguai e México
<i>Phomopsis tectonae</i>	Florestais	Malásia, Tailândia; Ilha de Bornés
<i>Drechslera sp</i>	Melão (<i>Cucumis Mello</i>)	Espanha, Holanda
<i>Curvularia tuberculata</i>	Arroz (<i>Oriza sativa</i>)	Colômbia

4.3- Unidade de Virologia

Destina-se a detecção, identificação e erradicação de vírus, viróides e fitoplasmas em germoplasma vegetal importado. De maneira geral, o diagnóstico da infecção viral em vegetais repousa sobre: **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 nucléicos específicos ao genoma do agente patogênico (métodos moleculares). Vários métodos são utilizados na detecção e na identificação de vírus e viróides, dependendo do material recebido. Os principais vírus e viróides detectados pela Unidade de Virologia estão citados na Tabela 4. Entre os métodos mais utilizados para o diagnóstico destacam-se:

Observação de sintomas em plântulas: As sementes são semeadas em caixas com solo esterilizado e mantidas em casa de vegetação para observação de sintomas típicos causados por vírus ou viróides (mosaico, deformação foliar, super brotamento, estrias, epinastia, clorose, etc...) em plântulas. Caso sejam observados alguns desses sintomas, procede-se a coleta de material para a execução de testes específicos.

Inoculação Mecânica em plantas hospedeiras: Folhas de plântulas apresentando sintoma são coletadas, trituradas em tampão fosfato (diluição 1/10) 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 lesões locais e 14 dias para o aparecimento de sintomas sistêmicos.

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, ambas 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 ultramicrótomo 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.

Sorologia: É a utilização de métodos imunológicos na detecção de um agente patogênico. No laboratório de virologia, são utilizadas as seguintes versões: **1. Imunodifusão dupla em agar gel** (Ouchterlony, 1962). Para esse teste, utiliza-se antissoros específicos para os vírus a serem testados, placas de petri com agar gel e o material a ser testado (antígeno). O antígeno é preparado macerando-se o tecido vegetal infectado e coando-se o mesmo em gaze. Para a detecção de vírus esféricos, distribui-se 16 ml de gel preparado com 0,75% agar noble, 0,85% NaCl e 0,02% de azida sódica em placas de petri. Para vírus alongados, o meio utilizado consiste de 0,8% agar noble, 0,5% sódio dodecil sulfato (SDS) e 1% de azida sódica (Gooding & Bing, 1970). Placas de vidro devem ser previamente tratadas com 0,1% formvar em clorofórmio para impermeabilizar o fundo da

mesma. Depois que o meio endurece, fura-se o gel, formando 4 grupos de orifícios, sendo que cada grupo consiste de um orifício central cercado de 6 outros formando um arranjo hexagonal. Cada orifício tem diâmetro de 5 mm e é separado dos outros por uma distância de aproximadamente 4 mm (Lin *et al.*, 1981). O anticorpo é colocado no orifício central e o material a ser testado (antígeno) nos orifícios que o cercam. Incuba-se a placa em câmara úmida, à temperatura ambiente e os resultados (linha de precipitação) são observados após 24 horas. **2. DAS ELISA** (Salazar, 1982). Coloca-se nos orifícios de uma placa de poliestireno (próprias para o teste de ELISA) IgG específico (antissoro) para o vírus a ser testado. Incuba-se a placa por 3 horas a 37°C. Após lavagens da placa (4 vezes de 3 minutos cada) com tampão PBS, os orifícios são cobertos com as amostras a serem testadas (antígenos) e mantidas em geladeira (4°C) por uma noite. Após lavagens da placa (4 vezes de 3 minutos cada) com tampão PBS, os orifícios são cobertos com uma solução de conjugado (anticorpo + enzima) e incubadas por 3 a 4 horas a 37°C ou à temperatura ambiente por 5 horas. Após lavagens da placa (4 vezes de 3 minutos cada) com tampão PBS, um substrato da enzima é adicionado em cada orifício e a placa é deixada à temperatura ambiente. Depois de 1 hora, uma primeira leitura é realizada. **3. Dot-ELISA ou NCM-ELISA** (CIP, 1990). Neste teste imunoenzimático, é usada, como suporte para a reação sorológica, uma membrana de nitrocelulose ou de nylon no lugar da placa de poliestireno. O teste é tão sensível quanto o DAS-ELISA. Uma pequena quantidade da amostra a ser testada é colocada sobre a membrana que pode ser utilizada imediatamente ou guardada para teste posterior. As áreas da membrana não utilizadas pelas amostras são bloqueadas com uma solução proteica especial e as partículas de vírus, se presentes na amostra, vão reagir com o anticorpo específico (IgG) do vírus. A detecção do complexo formado por antígeno e anticorpo é detectado com um anti-anticorpo marcado com uma enzima e um substrato apropriado. A intensidade da coloração da reação é proporcional à concentração de vírus na amostra. A membrana pode ser guardada mantendo o resultado do teste.

Eletroforese Reversa em Gel de Poliacrilamida/ R-PAGE : Amostras de tecido de plantas infectadas (1 g) são trituradas em nitrogênio líquido e homogeneizadas em 3 ml de tampão de extração e 4 ml de fenol saturado em TRIS. Centrifuga-se o material por 15 minutos a 8000 rpm e a fase aquosa é transferida para tubos limpos onde se adiciona 2 volumes de etanol e 3 gotas de acetato de sódio (4M). Deixa-se o material a -20 °C por 30 minutos e procede-se uma centrifugação a 8000 rpm por 15 minutos. Descarta-se o sobrenadante e o

pellet é lavado com etanol, seco e ressuspenso em 100 ul de tampão. Esta amostra é colocada em orifícios em gel de bis-acrilamida. A primeira corrida é realizada em tampão TBE 1 X a 20-30°C e a 43-46 mA. A segunda corrida é efetuada em tampão TBE 1/8 X a 71°C e 43-46 mA. O gel é então fixado em etanol (10%) e ácido acético (0.5%), corado em prata (0.2%) e reduzido em borohidrido de sódio, hidróxido de sódio e formaldeído (37% solução) (Singh & Boucher, 1987). Existem outras técnicas para fixar e corar o gel e estão descritas em Dusi & Marinho, 2001.

Hibridização de ácido nucléico - NASH (Nucleic Acid Spot Hybridization): Uma pequena quantidade de amostra (1ml a 2 ml) é colocada sobre a membrana de nitrocelulose ou de nylon, as áreas não utilizadas pelas amostras são bloqueadas, e as amostras são hibridizadas com uma sonda específica. A sonda reage com um conjugado específico marcado com uma enzima. O complexo formado é revelado utilizando-se um substrato apropriado (CIP, 1989).

PCR: Se as informações relativas às seqüências nucleotídicas de um organismo a ser detectado estão disponíveis, é possível sintetizar um número elevado de cópias de parte de seu genoma. Para isto, utiliza-se uma DNA polimerase termoestável e dois oligonucleotídeos de síntese ("primers"), respectivamente homólogos e complementares às duas seqüências oligonucleotídicas específicas desse organismo.

Quando a seqüência a ser detectada é constituída de RNA, como é o caso da grande maioria dos vírus de plantas, a reação enzimática deve ser precedida de uma transcrição inversa do RNA viral (RT) em DNA complementar (cDNA).

A primeira etapa da reação PCR consiste em aquecer a mistura contendo os "primers", a enzima, os quatro nucleotídeos precursores (dATP, dCTP, dTTP e dGTP) e o cDNA do vírus a ser detectado, à temperatura de $\pm 94^{\circ}\text{C}$. Um esfriamento lento permite em seguida aos oligonucleotídeos ("primers") de se parear às seqüências complementares presentes dentro da molécula do DNA a ser detectado. A fase de síntese do DNA (alongamento), a partir da extremidade 3' de cada um dos oligonucleotídeos, desenrola-se à temperatura ótima da enzima (72°C). Esta etapa de alongamento termina quando a temperatura atinge de novo o patamar acima do ponto de fusão das moléculas de DNA fita dupla. Esta etapa do segundo ciclo do PCR é denominada desnaturação.

O ciclo, compreendendo as etapas de desnaturação, hibridização dos oligos 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 (Hadidi et al., 1993; Halpern & Hillman, 1996).

Métodos para erradicação de vírus e viróides

Não existe tratamento químico que erradique vírus e viróides em plantas infectadas. Para a erradicação de vírus, submete-se o material infectado a termoterapia e/ou cultura de meristema. No caso de infecção por viróides, a limpeza do material só poderia ser eficiente utilizando-se crioterapia seguida de cultura de meristema. Este procedimento ainda não é utilizado em quarentena.

Métodos para preservação de Vírus

A coleção de vírus fitopatogênicos e seus isolados é uma importante atividade a ser desenvolvida em um laboratório de Quarentena. Esta coleção serve como referência para estudos de caracterização biológica, sorológica e molecular de vírus. A coleção de vírus fitopatogênicos é formada utilizando-se um dos métodos de conservação citados: 1. **"Deep-freeze"** onde as folhas infectadas são armazenadas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ em sacos plásticos. 2. **Secagem das folhas infectadas com cloreto de cálcio a $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$** : cobrir o fundo de uma placa de Petri com cloreto de cálcio anidro granulado e com pelo menos o dobro do peso de água do tecido (em geral cerca de 90%). Cobrir o CaCl_2 com um pedaço de gaze de nylon. Cortar as folhas infectadas em pedaços de cerca de 1 cm^2 e colocar sobre a gaze. Selar as placas de Petri com fita adesiva. Após 2 semanas colocar perclorato de magnésio ou CaCl_2 no fundo de um tubo. Cobrir com um pedaço de algodão. Colocar as folhas secas nos tubos e fechar com uma tampa de borracha ou com parafina. Armazenar em câmara fria ou geladeira. 3. **"Freeze-drying"**: tecido ou suco foliar de plantas infectadas podem ser secos a frio de diferentes formas. Antes de secar, o material é congelado. Congelamento abaixo de $-130\text{ }^{\circ}\text{C}$ com nitrogênio líquido é a melhor opção, mas a secagem é normalmente efetuada a temperaturas de $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ou um pouco mais alta e o material seco é armazenado em ampolas seladas. 4. Plantas infectadas mantidas e multiplicadas em quarentenário ou *"in vitro"*.

Tabela 4 . Principais vírus e viróides detectados em germoplasma vegetal importado

VÍRUS E VIRÓIDES	PRODUTO	PROCEDÊNCIA
Potato spindle tuber viroid (PSTvd)	Batata (<i>Solanum tuberosum</i>)	Argentina
Banana bunchy top Virus (BBTV)	Banana (<i>Musa</i> sp.)	Indonésia
Hop mosaic vírus (HMV)	Lúpulo (<i>Humulus lupulus</i>)	EUA
Hop latent viroid	Lúpulo (<i>Humulus lupulus</i>)	EUA
Bean common mosaic virus Southern bean mosaic virus	Feijão (<i>Phaseolus vulgaris</i>)	Colômbia
Cowpea aphid-born mosaic virus	Caupi (<i>Vigna unguiculata</i>)	Rússia
Leek yellow strip virus	Alho (<i>Allium sativus</i>)	EUA
Onion yellow dwarf virus Potato leaf roll virus	Batata (<i>Solanum tuberosum</i>) "in vitro"	EUA, Peru, Argentina
Potato vírus S	Batata (<i>Solanum tuberosum</i>) "in vitro"	EUA, Japão, Bolívia, Peru
Potato vírus X	Batata (<i>Solanum tuberosum</i>) "in vitro"	EUA, Peru
Potato vírus Y	Batata (<i>Solanum tuberosum</i>) "in vitro"	EUA , Japão
Sweet potato feathery motle virus	Batata doce (<i>Ipomoea batatas</i>)	Japão
Sweet potato latent virus	Batata doce (<i>Ipomoea batatas</i>)	Japão
Sweet potato chlorotic fleck virus	Batata doce (<i>Ipomoea batatas</i>)	Japão
Sweet potato mild mottle virus	Batata doce (<i>Ipomoea batatas</i>)	Japão

4.4 Unidade de Nematologia

Destina-se à detecção, à identificação e à erradicação de nematóides fitoparasitas em germoplasma vegetal importado, sendo utilizadas várias metodologias dependendo do tipo de material recebido. Esses métodos são:

Descascamento Manual: Para amostra com pequena quantidade de sementes, principalmente para aquelas que apresentam glumas e glumelas, tais como *Panicum* ou sementes de arroz, as partes externas das sementes são separadas do embrião e do endosperma, com pinça e estilete, e todas as partes são colocadas em água por no mínimo 2 horas. Depois desse tempo, são examinadas sob microscópio estereoscópio (Tenente et al. 1994).

Trituração: As sementes podem ser trituradas diretamente ou após a pré-imersão em água destilada durante 16 a 18 horas. Em ambos os casos a trituração das sementes em liquidificador deve ser de 20 à 30 segundos. A quantidade de água deve cobrir as sementes antes de triturá-las. Esta técnica não é recomendada para todo tipo de sementes, pois sementes de leguminosas, após a trituração, não podem ficar imersas, devem ser imediatamente passadas por peneiras e lavadas em água corrente. Neste caso, como há fermentação, os nematóides ficam paralisados ou morrem por falta de oxigenação, não sendo possível recuperá-los (Southey, 1986; Zuckerman et al. 1985; Zuckerman et al. 1990).

Peneiramento: Utiliza-se um conjunto de peneiras de porosidade diferentes, de acordo com o material a ser usado nas extrações (solo, raiz, ou sementes) e da espécie de nematóide a ser recuperado. As peneiras comumente utilizadas são de porosidade de 0,149mm (100 mesh); 0,074mm (200 mesh); 0,037mm (400 mesh) e 0,027mm (500 mesh). O material em extração é lavado sobre uma ou mais peneiras, com água corrente e recolhido em um becker seguido da observação sob microscópio estereoscópio (Southey, 1986; Zuckerman et al., 1985; Zuckerman et al., 1990).

Este método é usado em combinação com outras técnicas de extração – trituração, bandeja, funil de Baermann – para melhor visualização dos nematóides em microscópio.

Método da Bandeja: Neste método utiliza-se uma bandeja de aproximadamente 53x21x5cm onde se coloca, no fundo, uma tela de nylon e recobre-se com

papel toalha umedecido. O material a ser analisado é colocado por cima deste conjunto e recoberto por outra folha de papel toalha. Acrescenta-se na bandeja água destilada oxigenada a 2% suficiente para cobrir o material de extração. Após 24 horas, a tela, com o material vegetal, é removida para uma outra bandeja e a água da bandeja anterior passada por peneira de porosidade de 0,037 mm (400 mesh) ou 0,027mm (500 mesh). O material desta peneira é recuperado em um becker e colocado em uma placa de Petri para observação em microscópio estereoscópio. O procedimento descrito é repetido após 48 e 72 horas (Whitehead & Herming, 1965). Esta técnica é aplicada em materiais com número superior a 100 sementes, 100g de solo ou acima de 20 plântulas por amostra a ser analisada.

Técnica do Funil de Baermann: A técnica consta de 1 tubo (tubo de Duran), colocado em uma mangueira acoplada a haste do funil de vidro e onde se acrescenta água destilada oxigenada a 2%. A seguir, coloca-se na parte superior do funil uma pequena peneira de plástico coberta com papel toalha. Sobre o papel toalha, coloca-se o material vegetal a ser analisado. Após 24 horas, é realizada a primeira análise da suspensão contida no tubo de Duran, e repete-se este procedimento após 48 e 72 horas. Partes vegetativas e/ou sementes são trituradas em liquidificador e em seguida são peneiradas. Esta técnica é usada na extração de nematóides vermiformes de solo, tecidos de tubérculos, raízes, sementes e de solo aderido a material de propagação vegetativa (Southey, 1986).

Técnica do Papel Germinador: Utiliza-se papel germinador, tipo mata borrão ("germitex") umedecido, com dimensões de 37 x 25 cm, onde as sementes são colocadas com espaço de 2 cm entre si. O papel com as sementes é enrolado e incubado a 25 °C, com alta umidade, durante 8 dias. A seguir, as plântulas são colocadas no sistema do funil de Baermann e/ou Bandeja. Esta técnica permite a reidratação dos nematóides que estão em dormência nas sementes, facilitando a sua detecção (Tenente et al. 1994).

Centrifugação de Jenkins: Esta técnica pode ser usada para extração de nematóides de solo e raízes trituradas. Solo: Homogeneiza-se bem a amostra de solo e depois se retira uma alíquota de 100cc. Acrescenta-se 1000ml de água, agitando-se bem. Aguarda-se por 1 minuto e em seguida passa-se por peneira de porosidade de 0,074 mm (200 mesh) e 0,0275 mm (500 mesh). O material da peneira de 200 mesh é descartado. A suspensão da peneira de 500 mesh é

recolhida e centrifugada a 1.750 rpm por 5 minutos. Descarta-se cuidadosamente o sobrenadante, limpando-se as bordas para evitar possíveis acúmulos de impurezas. Adiciona-se ao tubo com o pellet uma solução de sacarose preparada com 500g de açúcar refinado e "Separan" na concentração 12,5 ppm dissolvidos em água, completando até 1 litro. Mistura-se bem a suspensão com bastão de vidro. Centrifuga-se novamente os tubos a 1750 rpm por um minuto e coloca-se o sobrenadante em peneira de (500 mesh) lavando bem com água corrente. Com o auxílio de jatos de água de uma pisseta, recolhe-se os nematóides da peneira para um becker. Essa suspensão é levada para observação em microscópio estereoscópio (Jenkins, 1964).

Elutriador de Fenwich - Método de extração de cistos de nematóides do solo e de sementes: Para a extração de cistos, deve-se colocar o solo sobre uma peneira no elutriador de Fenwich fazendo-se sucessivas lavagens. Os cistos são recolhidos em uma peneira de 100 mesh posicionada na base do aparelho. Coloca-se o material coletado em gerbox de plástico (15 x 15 cm), com papel de filtro, observando-se diretamente a presença de cistos ao microscópio estereoscópio (Southey, 1986; Zuckerman et al., 1985; Zuckerman et al., 1990).

Flutuação de cistos - Método de extração de cistos de nematóides do solo ou de sementes: Utiliza-se amostra de solo com 50g passada por peneira de 100 mesh (0,149 mm) para remover pedras ou outros detritos maiores. No caso de sementes e tubérculos (50g das partes externas), tritura-se em liquidificador por uns 20 segundos. A amostra é colocada em balão de fundo chato, de 1L, com 500 ml de água destilada e agitada por 10 minutos. Adiciona-se solução de sacarose mais Separan (12,5 ppm) até o início do gargalo do balão. Agita-se por 10 minutos. Completa-se com a solução de sacarose até o início do pescoço do balão. Deixa-se descansar por mais 10 minutos. Completa-se com um fio de água até a boca do balão. Verter um terço dessa suspensão em funil de Buckener contendo uma folha de papel de filtro, sem interrupção. Preparar mais de um funil para cada amostra, pois pode entupir, principalmente no caso de solo. Retira-se o papel ainda molhado e, após escorrer toda a solução, examina-se sob microscópio estereoscópio para verificar a presença de cistos.

A identificação dos fitonematóides é feita através de caracteres morfológicos, métodos bioquímicos (izoenzimas) e métodos moleculares (PCR).

Tabela 5. Principais nematóides interceptados em germoplasma vegetal importado.

NEMATÓIDE	PRODUTO	PROCEDÊNCIA
<i>Ditylenchus dipsa</i>	Alho (<i>Allium sativum</i>)	Chile, EUA
<i>Ditylenchus dipsaci</i> <i>Tylenchus</i> sp.	Amendoim (<i>Arachis hypogaea</i>)	Colômbia
<i>Aphelenchoides besseyi</i>	Arroz (<i>Oryza sativa</i>)	Colômbia, Cuba, EUA, Filipinas, França, Malásia, Nigéria
<i>Ditylenchus</i> sp.	Arroz (<i>Oryza sativa</i>)	EUA, Filipinas
<i>Anguina</i> sp. <i>Ditylenchus dipsaci</i>	Aveia (<i>Avena sativa</i>)	EUA
<i>Ditylenchus dipsaci</i>	Batata (<i>Solanum tuberosum</i>)	Canadá, EUA
<i>Globodera</i> sp.	Batata (<i>Solanum tuberosum</i>)	Chile, Holanda
<i>Ditylenchus</i> sp.	Milho (<i>Zea mays</i>)	Zâmbia, México, Chile
<i>Ditylenchus dipsaci</i>	Sorgo (<i>Sorghum bicolor</i>)	EUA, México
<i>Ditylenchus</i> sp.	Trigo (<i>Triticum aestivum</i>)	México, Paraguai
<i>Anguina</i> sp.	Trigo (<i>Triticum aestivum</i>)	EUA
<i>Aphelenchoides bicaudatus</i> <i>Ditylenchus</i> sp.	Uva (<i>Vitis spp.</i>)	França, EUA

4.5 Unidade de Bacteriologia

Destina-se à detecção, à identificação e à erradicação de bactérias fitopatogênicas em germoplasma vegetal importado. As bactérias fitopatogênicas são procariotos capazes de causar doenças em plantas e podem ser divididas em fastidiosas e não-fastidiosas. Geralmente, as bactérias fastidiosas são estudadas através de microscopia de transmissão ou através de testes moleculares, já que não podem ser cultivadas facilmente. Nesta categoria estão incluídos espiroplasmas, fitoplasmas e liberobactérias limitados ao floema; estão incluídas também as bactérias limitadas ao xilema, como *Xylella fastidiosa*, causadora da clorose variegada dos citrus (CVC). As principais bactérias fitopatogênicas não-fastidiosas pertencem a cinco grupos: Agrobactérias, Corynebactérias, Erwinias, Pseudomonas e Xanthomonas (Bradbury, 1986; Lelliott & Stead, 1987; Holt, 1993).

Estes patógenos podem estar associados a sementes, materiais de propagação vegetativa, restos de cultura, solos, nematóides e insetos. A análise oficial de materiais provenientes de países estrangeiros, num sistema de quarentena, visa detectar a presença de bacterioses ainda não registradas na região ou país onde os materiais são introduzidos (Marques et al., 1994).

As taxas de infecção bacteriana em lotes de sementes são freqüentemente baixas, variando de menos de 0,01 a 1%, o que dificulta sua detecção (Saettler et al., 1989; Samson et al., 1999). Essa detecção é realizada através de diferentes técnicas: (i) isolamento e cultivo do patógeno in vitro, (ii) microscopia ótica e eletrônica, (iii) sorologia, (iv) inoculação em plantas suscetíveis e (v) uso de técnicas moleculares. A identificação do organismo isolado utiliza igualmente essas técnicas, além de testes bioquímicos (Schaad, 1988). As principais bactérias fitopatogênicas detectadas pela unidade de bacteriologia estão elencadas na Tabela 6. A análise bacteriológica de sementes é feita por amostragem através de dois métodos: o **Plaqueamento** do lavado de grãos em meio de cultura geral ou semi-seletivo, se disponível, seguido da **Repicagem e identificação** das bactérias isoladas, do plantio das amostras em solo esterilizado e da observação das plantas, anotando-se a presença de sintomas (Marques et al., 1995).

Variações deste método visando a detecção mais eficiente de patógenos específicos também são utilizadas, como a **germinação de sementes de arroz em papel**

toalha para detecção de *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* e pv. *oryzicola* (Mew & Misra, 1994). Quando o germoplasma é introduzido na forma de estacas, bulbos, rizomas ou tubérculos, o material é **plantado em quarentenário** e observado quanto à presença de sintomas.

Todo material que apresentar sintomas de infecção bacteriológica é processado em laboratório visando o isolamento do organismo patogênico em meio de cultura (Gardan & Luisetti, 1987). Quando do crescimento de colônias bacterianas, as mesmas são analisadas com respeito à sua morfologia, à fisiologia e aos caracteres nutricionais e de patogenicidade, visando a sua identificação, que pode ser complementada através de testes imunológicos como ELISA, imunodifusão e imunofluorescência (Crowther, 1995; Herman, 1998). Métodos moleculares, como reação em cadeia da polimerase (PCR) e hibridização de sondas de ácidos nucleicos, estão sendo desenvolvidos e testados para serem implementados na rotina de inspeção (Howard & Whitcombe, 1997; Innis et al., 1990).

Tabela 6. Principais bactérias detectadas em germoplasma vegetal importado

BACTÉRIA	PRODUTO	PROCEDÊNCIA
<i>Burkholderia glumae</i>	Arroz (<i>Oryza sativa</i>)	França
<i>Acidovorax avenae</i> subsp. <i>avenae</i>	Arroz (<i>Oryza sativa</i>)	Colômbia
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>coronafaciens</i>	Aveia (<i>Avena sativa</i>)	USA
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>zinniae</i>	Zinia (<i>Zinia</i> sp.)	França
<i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>oryzae</i>	Arroz (<i>Oryza sativa</i>)	Filipinas e Colômbia
<i>Xanthomonas translucens</i> pv. <i>undulosa</i>	Trigo (<i>Triticum aestivum</i>) Triticale (<i>Triticum aestivum</i> x <i>Secale cereale</i>) Cevada (<i>Hordeum vulgare</i>)	México

5. Referências Bibliográficas

BARNETT, H. L. **Illustrations genera of imperfect fungi**. 2. ed. Minneapolis: Burgess, 1987. 219 p.

BRADBURY, J. F. **Guide to plant pathogenic bacteria**. London: CAB International Micological Institute, 1986. 332 p.

CASTRO, C.; OLIVEIRA, A. S.; GARRIDO, L. R. Preservação de fungos em papel filtro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 20, p.306, 1995.

CIP. **Non-radioactive PSTV detection kit (non-Rad-NASH)**: ELISA Kit-Instruction Manual. Lima, 1990.

CIP. **Non-radioactive PSTV detection kit (non-Rad-NASH)**: ELISA Kit-Instruction Manual. Lima, 1989.

DESCRIPTIONS of fungi and bacteria: n. 030–1020. Kew, England, Commonwealth Mycological Institute. 1964 –1990.

DESCRIPTIONS of fungi and bacteria: no. 1101 – 1370. England: CAB International - International Mycological Institute, 1992 – 1998.

CORDEIRO, Z. J. M.; MATOS, A. P.; SILVA, S. O. La cercosporiose noire au Brésil. **Infomusa**, Montpellier, v. 7, n. 1, p. 31. 1998.

CROWTHER, J. R. **Theory and practice**: methods in molecular biology. Totowa, NJ, Humana Press, 1995. v. 42. 220 p.

DUSI, A.; MARINHO, V. L. A. Métodos de diagnose de viróides. In: ALMEIDA, A. M. R.; LIMA, J. A. de A. (Ed.). **Princípios e técnicas de diagnose aplicados em fitovirologia**. Londrina: Embrapa Soja: Brasília: SBF, 2001. p. 125-140.

ELLIS, M. B. **Dematiaceous Hyphomycetes**. Kew, Surrey, England: CAB, 1971. 608. p.

ELLIS, M. B. **More Dematiaceous Hyphomycetes**. Kew, Surrey, England: CAB, 1976. 507 p.

GARDAN, L.; LUISETTI, J. **Méthodes d'isolement et d'identification des bactéries phytopatogènes**. Angers: INRA, 1987. 32 p.

GOODING, G. V.; BING, W. W. Serological identification of potato virus y and tobacco etch virus using immunodiffusion plants containing sodium dodecyl sulphate. **Phytopathology**, St. Paul, v. 60, p. 1293, 1970.

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**, St. Paul, 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**, St. Paul, v. 80, p. 219-222, 1996.

HANLIN, R. T. **Illustrated genera of Ascomycetes**. Minnesota: APS Press, 1990. 263 p.

HERMAN, B. **Fluorescence microscopy**. Oxford: Bios Scientific, 1998. 170 p.

HOLT, J. G. (Ed.). **Bergey's manual of determinative bacteriology**. 9. ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1993. 500 p.

HOWARD, J.; WHITCOMBE, D. M. (Ed.). **Diagnostic bacteriology protocols: methods in molecular biology**, Totowa, NJ: Humana Press, 1997. v. 46. 280 p.

INNIS, M. A.; GELFAND, D. H.; SNINSKY, J. J.; WHITE, T. J. (Ed.). **PCR protocols: a guide to methods and applications**. San Diego: Academic Press, 1990. 482 p.

INTERNATIONAL SEED TESTING ASSOCIATION. Seed health testing. **Seed Science and Technology**, Zurich, v. 4, p. 3-49, 1976.

JENKINS, W. R. A rapid centrifugal-flotation technique for separating nematodes from soil. **Plant Disease Report**, St. Paul, v. 48, p. 692, 1964.

KAHAN, R. P. **Plant protection and quarantine**. Boca Raton: CRV Press, 1989. 226 p. v.1: Biological concepts.

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.

LELLIOTT, R. A.; STEAD, D. E. **Methods for the diagnosis of bacterial diseases of plants**. Oxford: Blackwell, 1987. 216 p.

LIN, M. T.; ANJOS, J. R. N.; RIOS, G. P. Serological grouping of cowpea severe mosaic isolates from Central Brazil. **Phytopathology**, St. Paul, v. 71, p. 431-438, 1981.

MARQUES, A. S. dos A.; PARENTE, P. M. G.; MARINHO, V. L. de A.; BUSO, G. S. C. A quarentena e o intercâmbio de germoplasma vegetal no Brasil: a atuação do CENARGEN. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.30, n.2, p.143-154, 1995.

MARQUES, A. S. dos A.; ROBBS, C. F.; BOITEUX, L. S.; PARENTE, P. M. G. **Índice de fitobacterioses assinaladas no Brasil**. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN: EMBRAPA-SPI, 1994. 65 p.

MENDES, M. A. S.; SILVA, V. L. da; DIANESE, J. C.; FERREIRA, M. A. S. V.; SANTOS, C. E. N.; G. NETO, E.; URBEN, A. F.; CASTRO, C. **Fungos em plantas no Brasil**. Brasília: Embrapa Produção de Informação: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 1998. 555 p.

MENDES, M. A. S.; FERREIRA, M. A. S. V. Fungos patogênicos detectados em germoplasma vegetal introduzido no Brasil de 1990 a 1992. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 19, p. 449-454, 1994.

MEW, T. W.; MISRA, J. K. (Ed.). **A manual of rice seed health testing**. Philippines: IRRI, 1994. 113 p.

NÁVIA, D.; FLETCHMANN, C. H.; OLIVEIRA, M. R. V. Inspeção acarológica do

germoplasma vegetal intercambiado na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. In: SIMPÓSIO DE RECURSOS GENÉTICOS E BIOTECNOLOGIA PARA A AMÉRICA LATINA E CARIBE - SIRGEALC, 2., 1999, Brasília, DF. **Anais...** Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 1999.

NELSON, P. E.; TOUSSOUN, T. A.; MARASAS, W. F. O. **Fusarium species: an illustrated manual for identification.** Pennsylvania: The Pennsylvania State University Press, 1983. 193 p.

OLIVEIRA, M. R. V.; NÁVIA, D.; SILVA, C. A. Inspeção e identificação entomológica na quarentena de germoplasma vegetal, In: SIMPÓSIO DE RECURSOS GENÉTICOS E BIOTECNOLOGIA PARA A AMÉRICA LATINA E CARIBE – SIRGEALC, 2., 1999, Brasília, DF. **Anais...** Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 1999.

OUCHTERLONY, O. Diffusion-in-gel methods for immunological analysis. **IIProgram Allergy**, v. 6, p. 30-154, 1962.

SAETTLER, A. W.; SCHAAD, N. W.; ROTH, D. A. (Ed.). **Detection of bacteria in seed and other planting material.** Minnesota: APS Press, 1989. 122 p.

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

SAMSON, R., MARQUES, A., JACQUES, M. A., OLIVIER, V.; LAURENT, E. Maladies bactériennes des semences: de l'analyse de laboratoire aux risques encourus au champ. **PHM Revue Horticole**, v. 400, p. 32-36, 1999.

SCHAAD, N. W. (Ed.). **Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria.** Minnesota: APS Press, 1988. 158 p.

SILVANESAN, A. **The Bitunicate Ascomycetes.** Printed in Germany. 1983. 701p.

SILVANESAN, A. **Graminicolous species of Bipolaris, Curvularia, Drechslera, Exserohilum and their teleomorphs.** Wallingford, UK: CAB International, 1987.

SINGH, R. P.; BOUCHER, A. Electrophoretic separation of a severe from mild Strains of potato spindle tuber viroid. **Phytopathology**, St. Paul, v. 77, p.1588-1591, 1987.

SOUTHEY, J. F. (Ed.). **Laboratory methods for work with plant and soil nematodes**. London: Ministry of Agriculture, Fisheries and Food, 1986. 202 p.

SUTTON, B. C. The Coelomycetes: **fungi imperfect with Pycnidia acervuli and Stromata**. Surrey: CAB, Kew, 1980. 696 p.

TENENTE, R. C. V.; MANSO, E. S. B. G. C.; MENDES, M. A. S.; MARQUES, A. S. dos A. Seed health testing for nematode detection of plant germplasm by

CENARGEN. **Seed Science and Technology**, Zurich, v. 22 n. 3, p. 415-420, 1994.

TUITE, J. **Plant pathological methods: fungi and bacteria**. Minneapolis: Burgess, 1969. 239 p.

URBEN, A. F. Molecular and genetic structure of populations of *Fusarium oxysporum* (Schlechtend ex Fries) f. sp. *radicis lycopersici* Jarvis and **Shoemaker**. 1994. 194 f. Thesis (Ph.D.) - Faculty of Science University of Birmingham, Birmingham, UK.

WHITEHEAD, A. G.; HEMMING, J. R. A comparison of some quantitativemethods of extracting small vermiform nematodes from soil. **Annals of Applied Biology**, Cambridge, v. 55, p. 25-38, 1965.

ZUCKERMAN, B. M.; MAI, W. F.; HARRISON, M. B. (Ed.). **Plant nematology: laboratory manual**. Massachusetts: University of Massachusetts Agricultural Experiment Station, 1985. 212 p.

ZUCKERMAN, B. M.; MAI, W. F.; KRUSBERG, L.R. (Ed.). **Plant nematology: laboratory manual**. Massachusetts: University of Massachusetts Agricultural Experiment Station, 1990. 252 p.