FL 5034

DETECÇÃO DE VIRUS EM SEMENTES

Álvaro M.R. Almeida

CNPSo/EMBRAPA

INTRODUÇÃO

Um grande número de viroses que causam graves prejuízos à agricultura, são transmitidas através das sementes.

A simples troca, ou envio, de germoplasmas realizada entre países ou até dentro do próprio país, pode causar a disseminação de viroses transmissíveis por sementes.

O pesquisador, independente de sua área específica de estudo, bem como os produtores de sementes certificadas, devem ficar conscientes deste problema e consequentemente evitar sempre que possível, que ele ocorra. Por outro lado, técnicos envolvidos em serviços de quarentena devem pensar ainda na possibilidade de recuperar germoplasmas a partir de plântulas sadias obtidas de um lote de sementes infectadas. Isto, quando for possível.

Em todo os casos, para que os lotes de sementes sejam consideradas livres de vírus, é necessário que se procedam a testes de detecção.

É importante esclarecer, de imediato, que as técnicas utilizadas para detecção de vírus em sementes e mudas, não são tão práticos e simples como aquelas utilizadas para fungos e bactérias. Por outro lado, é necessário enfatizar que embora os virologistas tenham desenvolvido técnicas rápidas para detecção e identificação de vírus, elas não são suficientemente simples e econômicas para serem utilizadas rotineiramente em países como o Brasil.

Muitos estudos são ainda necessários nesta área. Até o momento, as pesquisas têm procurado detectar a presença do vírus na semente. Muito poucas têm correlacionado a detecção com a porcentagem de transmissão e reduzidos são os trabalhos epidemiológicos que sugerem porcentagens permissíveis de transmissão de vírus, para aqueles casos onde a resistência genética ainda não foi encontrada. Estes níveis permissíveis, ainda que dependentes da população de vetores, deverão ser avaliados de modo que os produtores não sejam seriamente prejudicados e possam conviver com a doença nos seus níveis mais baixos de infecção. Estudos detalhando os níveis de transmissão do vírus por semente, relacionados à redução de rendimento e níveis de infecção de sementes colhidas posteriormente são conhecidas em algumas culturas tais como cevada (Hockett & Davis, 1970) e alface (Zink et al., 1956). Torna-se ne-

cessário que os virologistas concentrem maiores esforços nesta área, de modo que se consigam estabelecer os níveis de transmissão de viroses para as culturas onde existe este tipo de problema. Não se consideram aqui, aquelas viroses encontradas normalmente nos campos de cultivo, infectando hospedeiros silvestres onde a erradicação é praticamente impossível.

Estudos epidemiológicos carecem de maiores estudos na área de virologia.

A transmissão de vírus por sementes é constatada em maior intensidade na família *Leguminosae*. No entanto, outras famílias também apresentam essa característica. Alguns exemplos constam do quadro 1.

TÉCNICAS DE DETECÇÃO

Basicamente, os métodos utilizados para detecção de vírus em sementes são divididos em doi grupos:

1. Teste de observação visual
   - 1.1. Avaliação de sintomas característicos nas sementes e/ou plântulas
   - 1.2. Avaliação de sintomas característicos em plantas indicadoras
2. Testes sorológicos
   - 2.1. Difusão radial em ágar
     - 2.1.1. Difusão radial simples
     - 2.1.2. Difusão radial dupla
   - 2.2. Aglutinação com latex
   - 2.3. ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent asSAy)
   - 2.4. DIB (Dot immuno binding)
   - 2.5. Immunoadsorção em microscópio eletrônico

As vantagens e desvantagens dos testes citados serão discutidos a seguir.

1- Teste de observação visual

Assumindo-se que o vírus é transmitido por sementes e que estas são provenientes de plantas infectadas, o plantio delas originará plântulas com sintomas de infecção. A proporção dessas plântulas vai depender de vários fatores, tais como: a- isolado do vírus; b- época de infecção; c- condições climáticas; d- culti

var; e- porcentagem de plantas infectadas no campo e, f- população de insetos vetores.

Nos testes realizados para observação visual de plântulas infectadas e para cálculo da porcentagem de transmissão é necessário conhecer-se, qual ou quais são os vírus que ocorrem na éspecie vegetal analisada e qual a porcentagem de transmissão. Isto vai determinar qual o número de sementes que devem ser utilizadas no teste. Em soja, o vírus do mosáico comum é transmitido em porcentagens variáveis de 0 a 60% (Conover, 1948; Porto & Hagedorn, 1975, Dunleavy, 1973). No CNPso tem-se utilizado rotineiramente, 500-1000 sementes por amostra. Entretanto, o vírus do mosáico da alface é transmitido em baixas porcentagens (0 a 8%) e devido à legislação americana exigir que os lotes de sementes devam conter 0% de transmissão, utiliza-se um número maior de sementes (30.000) para testes (Grogan, 1980).

Desta forma, quanto menor for a percentagem de transmissão, maior deverá ser o número de sementes testadas por amostra.

Os testes de observação visual exigem grande espaço para execução (telados ou casas de vegetação) além de necessitarem cerca de 30 dias para avaliação dos sintomas. No caso de não se observar qualquer sintoma ou sintoma característico é necessário indexar algumas plantas através de inoculação em hospedeiros diferenciais para comprovar, ou não, a presença de vírus. Isto pode ser dispensável dependendo da experiência do analista com determinados vírus e espécies vegetais. Analistas utilizaram, no passado, plantas de *Chenopodium quinoa* como indicadoras para o vírus do mosáico da alface. No entanto, plântulas de soja quando infectadas pelo vírus do mosáico comum da soja apresentam sintomas bem característicos que dispensam o uso de plantas indicadoras.

Se a concentração do vírus na plântula infectada for baixa, os testes de inoculação (indexação) poderão ser negativos.

De acordo com Lange et al. (1983) os testes de observação visual de plântulas para inspecção de transmissão de vírus por sementes apresenta algumas desvantagens: 1 - alguns sintomas não são característicos, dificultando o diagnóstico e necessitam analistas experimentados; 2 - a presença de plântulas sadias não confirma ausência de vírus (vírus com infecção latente) e há necessidade testes posteriores; 3 o tempo necessário para conclusão do teste é longo e é preciso de grande espaço para plantio das amostras a serem analisadas.

Por outro lado, as vantagens deste testes são: 1- simplicidade; 2- eco-

nomicidade; 3- o teste informa qual é a porcentagem real de transmissão do vírus.

2. Testes Sorológicos

Nestes testes utilizam-se antissoros específicos, preparados a partir do vírus purificado.

Vários métodos sorológicos têm sido utilizados na detecção de vírus em sementes, procurando diminuir o tempo de identificação do vírus infectante e aumentar o número de amostras analizadas. No entanto, estes métodos exigem para cada vírus, um antissoro específico. Análises de rotina exigirão constante produção de antissoros.

Inicialmente, os virologistas utilizaram técnicas tradicionais, tais como difusão radial simples ou dupla, em meio de ágar (Hamilton 1965; Shepard, 1970, Shepard & Segon, 1970; Lima & Purcifull, 1980; Carrol et al. 1979). Técnicas de difusão radial são economicos por não necessitarem equipamentos e/ou reagentes importados e são, em geral, adequados às condições brasileiras. Nos testes sorológicos, em que se faz uso da difusão com vírus alongados, é necessário utilizar substâncias capazes de fragmentar esses vírus de modo a permitir a difusão dos mesmos através do gel. Normalmente se utiliza SDS (Lima et al. & Purcifull, 1979).

2.1. Difusão Radial em Ágar

2.1.1. Difusão radial simples

Uma descrição do método é encontrada no trabalho de Araújo & Carvalho (1986). O antissoro, preparado para um específico vírus, é adicionado ao ágar e posteriormente distribuído numa placa de Petri. Após solidificado, perfura-se o gel em fileiras, obtendo-se 118 cavidades (placa de 7cm diâmetro) onde serão colocadas as amostras maceradas. As placas são mantidas a 24ºC por 24:48 horas. Nesse tempo, o extrato contendo o vírus se difunde no meio (difusão radial simples). A ocorrência de linhas brancas (halo de precipitado) ao redor das cavidades, confirma a presença do vírus na amostra testada.

As reações vão depender principalmente da concentração do vírus na amostra e do título do antissoro.

2.1.2. Difusão radial dupla

Neste método, o antissoro não é incorporado ao ágar, mas colocado num orifício central, ao redor do qual haverá outros orifícios nos quais se colocam os extratos a serem analisados. Tanto o extrato, quanto o antissoro, se difundirão no gel (difusão dupla). Haverá formação de linhas de precipitação, sempre que houver encontro do vírus e seu respectivo antissoro, em proporções adequadas.

Da mesma forma que o teste de difusão redial simples, as reações dependerão principalmente da concentração do vírus no extrato e do título do antissoro.

2.2. Aglutinação com latex

Micro-esferas de latex (0,81μ diâmetro) têm a capacidade de absorver o antissoro (ou antígeno) e aumentar o efeito aglutinante entre anticorpo e vírus.

Inicialmente efetua-se a adsorção do antissoro com as micro-esferas de latex. De acordo com Van Regenmortel (1982) esta ligação ocorre dentro de uma limitada faixa na concentração de antissoro ou imunoglobulina purificada. Estas micro-esferas, assim tradas, serão posteriormente utilizadas em testes de microprecipitina em mistura com extrato de sementes. A formação de precipitado indicará a presença de vírus no extrato analisado. Um esquema deste método é apresentado na figura 1.

Lundsgarrd (1976) sugeriu este teste para análise de rotina na detecção de sementes de cevada, infectadas pelo vírus do mosáico em faixa de cevada (Barley stripe mosaic vírus).

2.3. Teste de ELISA

Este teste, descrito em 1974 por Voller et al., foi adaptado para uso com viroses de plantas por Clark & Adams (1977). ELISA possui algumas vantagens sobre os testes sorológicos comentados anteriormente (2.1.1 e 2.1.2) e tem sido, atualmente, utilizado em inúmeras áreas de pesquisa.

Suas vantagens básicas são: a- grande sensibilidade; b- rapidez e c- economia de antissoro. Centenas de amostras podem ser realizadas em 9-10 horas.

O teste baseia-se na atividade de uma enzima (ex. fosfatase alcalina, peroxidase; B-galactosidase, etc.) ligada à imunoglobulina específica para determinado vírus, sobre um determinado substrato. Um esquema do método está nas figuras 2 e 3.

Diversas alternativas desta técnica foram criadas (Koenig & Paul, 1982)

mas não serão discutidas neste trabalho.

O teste de ELISA foi utilizado pela primeira vez, na detecção de vírus em sementes, por Lister (1978). De acordo com o autor, a sensibilidade do teste aumentou quando foi utilizado hipocótidos de sementes germinadas.

As dificuldades para execução rotineira deste teste estão relacionadas à aquisição de equipamentos importados e ao custo dos reagentes cuja maioria é também importada.

Uma importante observação quanto ao uso da técnica de ELISA está nos estudos de Lister (1978) e Mataka et el. (1983), os quais encontraram proporcionalidade entre a detecção do vírus do mosáico comum em sementes de soja e a detecção visual do vírus em plântulas provenientes dos mesmos lotes de sementes analisadas por ELISA.

Por outro lado, Childress & Ramsdell (1986) não obtiveram essa correlação em trabalho com o "blueberry leaf mottle vírus".

Essas discrepâncias sugerem a necessidade de mais pesquisas nesta área.

2.4. DIB

O método conhecido com "dot immunobinding" foi descrito por Towbin & Gordon (1984). Seu funcionamento é semelhante ao método de ELISA. O suporte físico utilizado aqui é a membrana de nitrocelulose ao invés de microplacas (ELISA). DIB foi utilizado por Wang et al. (1985) para detecção do vírus do mosáico comum do feijão, em sementes.

De acordo com Lange & Heide (1986), a vantagem do método DIB sobre a técnica de ELISA é que ele não necessita do leitor de microplacas e utiliza menores quantidades de imunoglobulina e de conjugado.

No entanto, nossa experiência no Brasil mostra um alto custo para as membranas de nitrocelulose.

Outra desvantagem refere-se à impossibilidade de quantificar o teor de vírus na amostra visto que o método DIB é apenas qualitativo.

2.5. Imunoadsorção em microscopia eletrônica (IME)

Esta técnica baseia-se no fenômeno de decoração e corresponde à formação de uma camada contínua, formada por anticorpos, ao redor da partícula de vírus.

Apenas o vírus, para o qual o antissoro foi preparado, será coberto pelo antissoro.

A técnica de imunoadsorção em microscopia eletrônica foi utilizada primeiramente por Derrick (1973), com outra denominação: microscopia eletronica sorologicamente específica. Essa denominação foi posteriormente alterada (IME) por Roberts & Harrison (1979).

Resumidamente, a técnica consiste em se cobrir os grids (previamente preparados com carbono), com determinado antissoro. Após 30 minutos, retira-se todo o excesso e cobre-se novamente com a suspensão contendo o vírus ou extrato de planta ou semente.

Os anticorpos adsorvidos pelo grid se ligarão às partículas do vírus homólogo do antissoro. Procede-se à coloração negativa e a seguir observa-se no microscópio eletrônico.

A técnica IME apresenta algumas vantagens, tais como: sensibilidade, análise quantitativa e rapidez. É necessário contudo, ter em mãos os antissoros dos principais vírus presentes na espécie analisada.

De acordo com Lange et al. (1983), é necessário determinar o melhor tampão para o teste. Segundo estes autores, tampão fosfato 0,05M pH 7,0 foi adequado para alguns vírus mas não foi para outros.

A possibilidade de uso da IME no Brasil não é encorajadora. Além da baixa disponibilidade de ME no país, os aprelhos existentes são super-utilizados, reduzindo a chance de uso rotineiro com IME em trabalhos cooperativos.

SUMÁRIO

A preocupação existente entre fitopatologistas quanto aos aspectos epidemiológicos de virosestransmissíveis por sementes, são evidentes em todos os congressos anuais da Sociedade Brasileira de Fitopatologia.

Diversos virologistas (Nagai & Costa, 1971; Costa et al., 1971) têm controlado esse problema, na medida do possível, através do uso de genótipos com resistência genética. Na impossibilidade de se usar resistência à infecção pelo vírus, existe a possibilidade de se utilizar resistência à transmissão (Bowers et al. 1982). Além disso, o processo epidemiológico pode também ser reduzido ou eliminado pelo emprego da resistência ao vetor (Daubeny & Stary, 1982; Irwin & Goodman, 1980º.

Na impossibilidade de se encontrar ou utilizar qualquer destes tipos de resistência genética, torna-se necessário então, se estabelecer os níveis mínimos permissíveis de transmissão, reconhecendo-se particularidades de cada complexo vírus-hospedeiro.

Foi considerando a importância dos vírus transmitidos por sementes que os virologistas desenvolveram e/ou aperfeiçoaram técnicas sensíveis e rápidas para detecção de vírus em sementes. No entanto, ainda existem grandes questões quanto à importância de detecção do vírus e a taxa de transmissão em plântulas, que servirão como fonte de inóculo para disseminação de doenças no campo e serão responsáveis pelos danos à cultura. De acordo com Zink et al. (1956) a porcentagem de plantas de alface que se tornam infectadas no campo depende da quantidade de sementes infectadas utilizadas no plantio e da mobilidade dos insetos vetores. Segundo os autores, se a taxa de transmissão do vírus do mosáico da alface excede o,1%, o controle é insatisfatório. Similar efeito foi observado por Hockett & Davis (1970) com o vírus do mosáico em faixas da cevada. Porcentagens de transmissão superior a 4% no plantio causaram aumento na porcentagem de transmissão das sementes colhidas.

Os métodos de ELISA e DIB, por exemplo, não separam partículas infectivas e não infectivas. Consequentemente, valores obtido na detecção podem não se correlacionarem a valores obtidos na transmissão observada em plântulas.

De acordo com Hamilton (1983), a sensibilidade destes métodos pode causar a desqualificação de um lote de sementes certificadas apenas pela confirmação de um embrião infectado que, pode ou não, originar uma plântula infectada. Por outro lado, infecção do tegumento, originaria um resultado positivo mas o vírus com cer-

teza não infectaria a plântula. Ainda, segundo Hamilton (1983), qualquer resultado positivo é sem significância desde que não se associe informações sobre a taxa de transmissão.

Lister (1978) obteve valores próximos ao comparar detecção e transmissão ao testar lotes de sementes infectadas com vírus do mosáico comum de soja, utilizando hipocótilos de sementes germinadas. Esta metodologia é interessante, visto que, as mesmas sementes utilizadas em testes de germinação seriam utilizadas nos testes de detecção do vírus, utilizando-se os hipocótilos. O uso de hipocótilos foi também por Lima & Purcifull (1980), nos testes sorológicos de difusão radial.

Um estudo feito por Van Regenmortel (1982) consta do quadro 2 e compara a sensibilidade de vários testes sorológicos.

Na atual situação, são poucos os casos onde a detecção está correlacionada à transmissão. De igual modo, são poucos os casos em que se conhece o nível de danos a partir de um nível conhecido de transmissão, considerando condições normais para desenvolvimento de insetos vetores.

Em países, cujos reagentes para ELISA ou DIB necessitam de importação e custam muito caro, acredita-se que o uso de técnicas econômicas e eficientes como difusão radial e/ou testes de observação visual são suficientemente eficientes para testes rotineiros. A produção de antissoros para um limitado número de vírus pode ser obtido através de um sistema cooperativo entre o laboratório de análise de sementes e os laboratórios de virologia normalmente estabelecidos em universidades ou alguns órgãos de pesquisa.

Sumarizando, é importante que se discutam várias questões antes de se decidir por qual método utilizar na detecção de vírus por sementes.

Sugere-se aos epidemiologistas e virologistas do Brasil que se empenhem em estudos cooperativos que permitam correlacionar detecção com transmissão além de se aprofundarem em estudos dos diversos complexos vírus-hospedeiro, existentes nas nossas condições.