

Uso de técnicas moleculares para diagnose de patógenos em sementes

Ellen Noly Barrocas¹
José da Cruz Machado²
Antonia dos Reis Figueira³
Ricardo Magela de Souza⁴
Alessandra Keiko Nakasone Ishida⁵
Ana Beatriz Zacaroni⁶
Hermínio Souza Rocha⁷

Resumo - A associação de fitopatógenos com sementes tem sido responsável por danos dos mais significativos em cultivos de interesse humano, causando prejuízos tanto para produtores de sementes como para produtores e consumidores de grãos, além dos efeitos danosos a todo sistema produtivo. O diagnóstico preciso de patógenos, quando ainda estão em sementes e/ou materiais de propagação vegetal, é uma das mais importantes estratégias de manejo de doenças, já que previne sua entrada no campo. A dificuldade de distinção entre algumas espécies e outras formas de variação dos agentes patogênicos, aliada às circunstâncias de alta pressão de análises de amostras em determinadas épocas do ano, obriga o uso de métodos de detecção mais sensíveis, rápidos, simples e acurados. Para enfrentar esses desafios, as técnicas moleculares, em conjunto com métodos biológicos, surgem como importantes ferramentas, que, uma vez desenvolvidas e ajustadas, podem atender, satisfatoriamente, aos sistemas envolvidos nesse tipo de demanda.

Palavras-chave: Patologia da semente. Diagnose molecular. Fungos. Bactérias. Vírus.

INTRODUÇÃO

A detecção de patógenos em sementes e outros materiais de propagação vegetal é uma das mais importantes etapas no sistema de produção agrícola e torna-se cada vez mais imprescindível pelos reflexos que produz em termos de garantia de produções e sustentabilidade dessas atividades,

principalmente em países, cuja economia e demanda social dependem, em grande parte, do setor agropecuário.

Por ser a semente um insumo básico para a produção da maioria das espécies vegetais de interesse humano, é a sua qualidade um aspecto que exige, por parte dos sistemas de certificação de qualidade,

maior atenção e um extremo cuidado, por parte dos órgãos controladores desses insumos.

A qualidade sanitária das sementes é, atualmente, o aspecto que mais tem merecido atenção nos sistemas produtivos e no comércio agrícola, considerando-se os reflexos negativos que a associação de

¹Eng^a Agr^a, D.Sc., *Pesq. PNP/DCAPES/UFLA - Dep^o Fitopatologia, Caixa Postal 3037, CEP 37200-000 Lavras-MG. Correio eletrônico: ellennoly@gmail.com*

²Eng^a Agr^a, Ph.D., *Prof. Tit. UFLA - Dep^o Fitopatologia, Caixa Postal 3037, CEP 37200-000 Lavras-MG. Correio eletrônico: machado@ufla.br*

³Química, Ph.D., *Prof. Tit. UFLA - Dep^o Fitopatologia, Caixa Postal 3037, CEP 37200-000 Lavras-MG. Correio eletrônico: antonia@ufla.br*

⁴Eng^a Agr^a, D.Sc., *Prof. Associado UFLA - Dep^o Fitopatologia, Caixa Postal 3037, CEP 37200-000 Lavras-MG. Correio eletrônico: rmagelas@ufla.br*

⁵Eng^a Agr^a, D.Sc., *Pesq. Embrapa Amazônia Oriental, Caixa Postal 48, CEP 66095-100 Belém-PA. Correio eletrônico: keiko@cpatu.embrapa.br*

⁶Eng^a Agr^a, *Doutoranda UFLA - Dep^o Fitopatologia, Caixa Postal 3037, CEP 37200-000 Lavras-MG. Correio eletrônico: anabeatriz.zacaroni@gmail.com*

⁷Eng^a Agr^a, D.Sc., *Bolsista FAPEMIG/U.R. EPAMIG SM - FECD, Caixa Postal 33, CEP 37780-000 Caldas-MG. Correio eletrônico: hsrocha2009@gmail.com*

patógenos com sementes pode determinar sob diversos ângulos.

O grande número de patógenos, aliado à alta variabilidade e semelhanças morfológicas entre espécies, que se associam às sementes de modo geral é fator complicador para a detecção e identificação correta desses agentes em análises de rotina. Dessa forma, percebe-se que métodos de detecção e de identificação de patógenos, com base em aspectos morfológicos ou outros que são influenciados facilmente por fatores ambientais, não atendem às necessidades dos sistemas de controle de qualidade em nível de rotina. Soma-se a estas dificuldades o fato de que o atendimento à demanda de um grande volume de análises, em curtos períodos, faz com que o uso de alguns testes de sanidade cause maiores problemas de natureza logística aos produtores e usuários de sementes em geral.

Dentre as estratégias que podem ser lançadas para a detecção e identificação mais rápida e precisa de determinados patógenos, com grandes semelhanças morfológicas ou que apresentam dificuldades de desenvolvimento nos testes biológicos já conhecidos, está o uso de técnicas moleculares. Por este método, a análise é mais rápida e acurada. O rápido avanço das pesquisas nesse campo já tem disponibilizado um bom número de métodos para alguns patógenos que são transmitidos ou transportados pelas sementes de espécies hospedeiras.

Neste artigo, o foco está voltado para os principais métodos moleculares existentes para a detecção de patógenos dos diferentes grupos taxonômicos, com ênfase em fungos, bactérias e vírus. Para mais detalhes sobre métodos de detecção de patógenos em sementes, sob a égide dos Programas de Certificação no Brasil, recomenda-se consultar o Manual de Análise Sanitária de Sementes (BRASIL, 2009).

DETECÇÃO MOLECULAR DE FUNGOS EM SEMENTES

Os critérios utilizados para a detecção de fungos em sementes seguem, de modo geral, as mesmas regras adotadas pela In-

ternational Seed Testing Association (Ista) e, em sua maioria, consistem em estimular os microrganismos a produzirem estruturas, ou alguns metabólitos, que permitam a sua identificação.

Os métodos utilizados na detecção de fungos em sementes baseiam-se em diferentes aspectos, que variam desde análise visual da amostra e da fração impura, exame microscópico da suspensão proveniente da lavagem de sementes, exame de embriões, método do rolo de papel, incubação em meios de cultura padronizados ou meios semisseletivos e incubação em substrato de papel de filtro (*blotter test*).

Esses métodos, apesar de padronizados e usados em testes de rotina, apresentam limitações, quando existe a necessidade da diagnose em nível de algumas espécies, subespécies, variedades e raças. Um bom exemplo é a dificuldade de distinção entre os agentes da antracnose (*Colletotrichum gossypii*) e ramulose (*Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*) do algodoeiro. Embora sejam relatadas diferenças entre os dois agentes na literatura, na prática, muitas vezes, não é possível discernir com clareza quais os patógenos associados às sementes, já que existe grande variabilidade até mesmo entre os isolados desses fungos.

Somam-se a essa dificuldade outras, como a demora na obtenção de resultados para alguns patossistemas e a dificuldade de distinção, quando outros organismos, também associados às sementes, apresentam maior potencial de competição. A identificação correta das espécies do complexo *Stenocarpella*, causadoras da podridão do colmo e da espiga do milho, por exemplo, só é possível com a formação dos picnídios e esporos que os identificam. Para isso, é necessária a incubação das sementes por 15 dias. Durante esse tempo, o aparecimento de outros organismos pode comprometer a correta identificação daquelas espécies.

Em relação a outros patossistemas, inúmeras dificuldades ainda constituem desafio para as pesquisas em patologia de sementes. Muitas espécies de fungos proximamente relacionadas encontram similaridade entre

suas características morfológicas, dificultando a identificação precisa, como é o caso de espécies de *Phomopsis* em sementes de soja, *Drechslera* em sementes de arroz e trigo e *Fusarium* em sementes de feijão e algodão.

A correta diagnose dos patógenos é, portanto, uma das ferramentas básicas no controle de doenças transmitidas por sementes. Diferentes trabalhos de pesquisa têm sido desenvolvidos, investigando metodologias que auxiliem na correta detecção, na identificação e até na quantificação de patógenos utilizando diferentes métodos, combinados entre si ou não.

A Biologia Molecular veio ao encontro dos interesses da fitopatologia, disponibilizando ferramentas que auxiliam na diagnose e identificação de patógenos que apresentam dificuldades por métodos tradicionais. Essas técnicas, por meio das diferenças existentes entre sequências do ácido desoxirribonucleico (DNA), permitiram o avanço no conhecimento de genomas de espécies, subespécies e até raças diferentes com alto grau de especificidade.

Inicialmente, os trabalhos de diagnose de fungos em sementes consistiam no isolamento dos fungos dessas sementes e a sua detecção era realizada em meios de cultura, já que uma das maiores dificuldades para a detecção nas sementes seria a presença de inibidores. Muitas espécies podem conter naturalmente em suas sementes substâncias como taninos, componentes fenólicos e carboidratos capazes de inibir ou influenciar a atuação da enzima Taq polimerase utilizada na reação em cadeia da polimerase – *polymerase chain reaction* (PCR). Nesse caso, há redução da sensibilidade, dificultando as amplificações das regiões estudadas e gerando resultado falso-negativo, quando a extração é feita diretamente de sementes maceradas. Para reduzir esse efeito são recomendadas etapas adicionais para a extração de DNA e purificação. São utilizadas substâncias como clorofórmio e fenol para a precipitação de alguns desses inibidores, ou o uso de *kits* comerciais, que têm-se mostrado como um grande facilitador da técnica, já que agiliza o processo

de automação para a extração de DNA e minimiza a ação dos inibidores.

Apesar das dificuldades apresentadas, diversos trabalhos têm sido desenvolvidos para a detecção de fungos diretamente nas sementes. No Quadro 1 estão listados alguns trabalhos de publicação recente.

Nos últimos 30 anos, o avanço em estudos de genômica e bioinformática tem revolucionado e aproximado ainda mais o desenvolvimento de tecnologias de diagnóstico em suporte aos métodos clássicos, tornando a detecção de patógeno mais rápida, acurada e sensível. O foco dessas técnicas baseia-se no estudo de regiões do genoma dos patógenos, a fim de identificar sequências específicas no DNA. Os marcadores moleculares como *random amplified polymorphic* (RAPDs), *restriction fragment length polymorphisms* (RFLPs), *amplified fragment length polymorphisms* (AFLP), microssatélites, dentre outros, têm sido largamente usados em estudos de diferenciação de patógenos.

Da mesma forma, sequências já conhecidas, como por exemplo genes do DNA ribossomal (rDNA), que são facilmente obtidos do genoma de fungos, têm sido avaliadas. Os rDNAs codificam os RNAs ribossomais (rRNAs) e são relativamente conservados entre os fungos, além de aparecerem repetidos centenas de vezes no genoma fúngico. Estão incluídas as porções 18S, 5.8S e 28S, separadas por regiões espaçadoras conhecidas como *internal transcribed spacer region* (ITS) (Fig. 1). Apesar de essas regiões não serem traduzidas em proteínas, possuem um papel importante no desenvolvimento das funções do mRNA, com sequências que variam entre espécies, demonstrando ser promissoras para a construção de *primers* (pequenas sondas de oligonucleotídeos) específicos.

Os estudos de filogenia também complementam os de variabilidade, além da possibilidade de identificação da origem de isolados e análise de divergência genética entre grupos. Nesse estudo, além das regiões ITS e *intergenic spacer region* (IGS),

genes que codificam para histonas, fator de alongação - *elongation factor* (EF) e beta tubulina, genes ligados à patogenicidade ou à produção de toxinas também têm sido estudados e podem ser bons candidatos para a construção de *primers*.

Para a detecção de fungos, especificamente em sementes, é necessário que, independente do método adotado, o par de *primers* seja testado quanto à especificidade e otimizado para o máximo de sensibilidade, tanto para a colônia pura de fungos, como em associação com sementes, uma vez que a sensibilidade entre um e outro pode variar. Dombrowski et al. (2006) avaliaram a concentração necessária para a detecção de *Neotyphodium* sp.,

em cultura pura e na cultura associada à semente de azevém, e concluíram que a quantidade necessária para detectar o fungo, quando ele está associado às sementes, é dez vezes maior do que quando está em cultura pura.

A partir de sequências conhecidas é possível a amplificação dos fragmentos por meio da técnica PCR. Para a detecção de patógenos associados às sementes, os fatores já descritos anteriormente devem ser ponderados, de modo que evitem a interferência de inibidores que podem gerar resultados errôneos. Para a patologia de sementes, a técnica de PCR, associada a outras, tem sido utilizada com sucesso para

QUADRO 1 - Exemplos de trabalhos publicados com detecção molecular de patógenos diretamente nas sementes

Patógeno/Hospedeiro	Fonte
<i>Fusarium circinatum</i> (pinus)	Ioss et al. (2009)
<i>Septoria tritici</i> (trigo)	Consolo et al. (2009)
<i>Pyrenophora graminea</i> (cevada)	Justesen, Hansen e Pinnschmidt, (2008)
<i>Stenocarpella</i> sp. (milho)	Barrocas (2008)
<i>Botrytis</i> spp. (cebola)	Chilvers et al. (2007)
<i>Rhynchosporium secalis</i> (cevada)	Ríos, Fernández e Carmona (2007)
<i>Plasmopara hastedii</i> (girassol)	Ioos et al. (2007)
<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>basilici</i> (manjeriço)	Pasquali et al. (2006)
<i>Neotyphodium</i> (centeio)	Dombrowski et al. (2006)
<i>Magnaporthe grisea</i> (arroz)	Chadha e Gopalakrishna (2006)
<i>Diaporthe phaseolorum</i> var. <i>meridionalis</i> (soja)	Vechiato, Maringoni e Martins (2006)

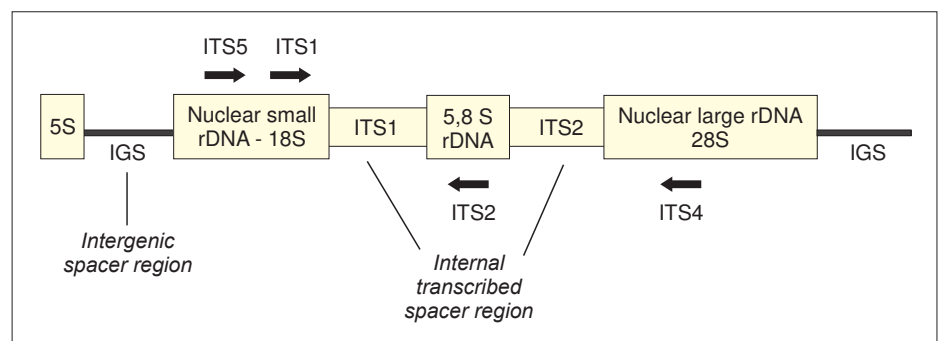


Figura 1 - Esquema representativo do DNA ribossomal (rDNA) mostrando a localização de primers padrões utilizados na PCR

NOTA: PCR - Polymerase chain reaction.

o diagnóstico de espécies que apresentam difícil distinção por meio de marcadores morfológicos, fungos com reduzida esporulação, que produzem micélio estéril e os suprimidos por fungos de crescimento mais rápido, além de estimar o potencial toxicológico dos fungos em sementes.

Apesar da grande sensibilidade da técnica de PCR convencional, os trabalhos envolvendo a diagnose de patógenos associados às sementes encontram obstáculos, quando estão com baixos níveis de infestação/infecção. Para contornar o problema utiliza-se a Bio-PCR, que tem o objetivo de enriquecer a biomassa do fungo na semente, para aumentar a sensibilidade da técnica e absorção ou diluição de componentes inibidores durante o período de incubação. A Bio-PCR envolve uma etapa de incubação das sementes, em condições de alta umidade relativa, por períodos que podem variar de cinco a sete dias ou mais, dependendo do organismo-alvo. Apesar do acréscimo de mais uma etapa ao processo, para muitos fungos torna-se indispensável para uma diagnose confiável. Para o diagnóstico de *Magnaporthe grisea* em sementes de arroz infestadas, é necessária a sua incubação em meio batata dextrose ágar (BDA), por 48 horas, a 25°C, sob agitação constante (CHADHA; GOPALAKRISHNA, 2006). Vechiato, Maringoni e Martins (2006) utilizaram o tempo de sete dias de incubação prévia para a detecção de *Diaporthe phaseolorum* var. *meridionalis* em sementes de soja.

A Bio-PCR possui vantagens sobre a PCR convencional, incluindo o aumento de sensibilidade e a detecção somente de células viáveis, mas possui desvantagens, como o aumento do tempo para diagnose e a necessidade de determinação do tempo de enriquecimento. O longo tempo de incubação pode permitir o crescimento de organismos saprófitas, que podem interferir na detecção do organismo-alvo (DOMBROWSKI et al., 2006).

É importante ainda salientar que a PCR

convencional indica somente presença ou ausência do patógeno, o que pode ser um fator limitante para a patologia de sementes, quando existe a necessidade de determinar a incidência do patógeno no lote. Por outro lado, para patógenos como *Sclerotinia sclerotiorum*, cujo índice de tolerância em sementes é zero, o teste pode ser recomendado. Para outros patossistemas, o uso de PCR convencional pode funcionar como um primeiro *screening* para informar se o lote está infectado ou não, permitindo rapidamente a comercialização dos lotes sadios. Para os lotes considerados infectados, outras técnicas complementares podem indicar a incidência do patógeno.

Mesmo com a utilização da PCR convencional, a sensibilidade da técnica ainda permite detectar lotes com baixos níveis de infecção, conforme pode ser observado na Figura 2.

A introdução da PCR em tempo real facilitou o desenvolvimento de trabalhos de quantificação dos organismos-alvo de detecção. Durante o desenvolvimento do método, é medido o acúmulo dos produtos da PCR, o que permite sua quantificação. Quando comparado com a PCR convencional, apresenta vantagens como maior rapidez, redução do risco de contaminações cruzadas, eliminação da eletroforese para determinar os resultados da PCR, quantificação do patógeno, mesmo em baixíssimas quantidades, o que em patologia de sementes torna-se de grande valia, uma vez que determina o nível de infecção de um lote de sementes. Alguns trabalhos conseguem a quantificação de até um esporo por semente

contaminada (CHILVERS et al., 2007). Essas vantagens podem ser promissoras para a detecção de patógenos, eliminando muitas barreiras para a sua detecção em sementes.

Normalmente, as técnicas de análise molecular para fungos são desenvolvidas, utilizando culturas puras para identificar espécies ou genótipos dentro de populações. Para patologia de sementes, a utilização de quaisquer técnicas moleculares tem sua aplicação prática em um sistema de análises em escala, se houver o seu desenvolvimento para a detecção direta na semente, já que pouco se ganha em termos de diagnose, quando existe a necessidade de isolamento do patógeno em cultura pura para posterior detecção.

Muitos desafios ainda existem para a detecção de fungos em sementes. Neste sentido, percebe-se que o uso das ferramentas moleculares representa um grande avanço e pode contribuir de maneira mais precisa e rápida para a diagnose preventiva desses e de outros microrganismos patogênicos, em associação com sementes de plantas cultivadas. Dessa forma, o controle de importantes doenças pode ser alcançado com sucesso por meio do manejo sanitário preventivo, em que o uso de sementes sadias ou tratadas é uma alternativa eficaz e de custo relativamente baixo.

DETECÇÃO MOLECULAR DE BACTÉRIAS EM SEMENTES

A associação com as sementes de seus hospedeiros é um dos mecanismos de

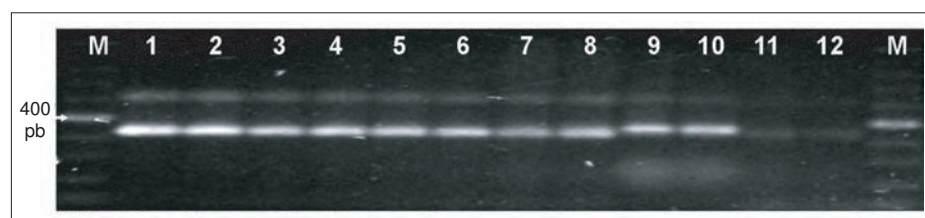


Figura 2 - Amplificação do DNA genômico de *Stenocarpella maydis* em diferentes níveis de infecção em sementes de milho

FONTE: Barrocas (2008).

NOTA: Linha M= 100-bp DNA ladder; 1-2=100%; 3-4=20%; 5-6= 10%; 7-8=2%; 9-10=1%; 11-12=0%.

M – Marcador de peso molecular; bp – Pares de base.

sobrevivência desenvolvido pelas fitobactérias e permite o seu transporte e transferência de inóculo no tempo e no espaço (OLIVEIRA; MOURA; SOUZA, 2005). Quando se mencionam bactérias em associação com sementes, isso pode significar tanto a bactéria infectando a semente alojada em seus tecidos como, simplesmente, infestando-a, isto é, a bactéria aderida na semente, sem causar infecção.

Com o avanço da biotecnologia, várias técnicas moleculares têm sido utilizadas em procedimentos de detecção, com o intuito de rapidamente diagnosticar e caracterizar o patógeno. Tais técnicas baseiam-se em métodos sorológicos, na amplificação de uma parte específica do DNA do genoma da bactéria de interesse, no desenvolvimento de sondas fluorescentes e na citometria de fluxo.

Vários métodos sorológicos são usados para identificar e detectar bactérias fitopatogênicas em sementes, desde os mais simples, como aglutinação em lâminas, até os mais complexos, como *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) e imunofluorescência (IF).

Trujillo e Saettler (1979) compararam a análise combinada de meio semisseletivo e teste de dupla difusão com o teste de patogenicidade padrão. De 175 amostras testadas, 61 apresentaram reações positivas pelo teste padrão e 90, pelo teste de dupla difusão e meio semisseletivo.

O teste ELISA baseia-se na ocorrência do complexo antígeno-anticorpo, por meio do desenvolvimento enzimático rápido de um produto colorido distinto. O teste foi utilizado com sucesso na detecção de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* em sementes de feijão, *X. campestris* pv. *campestris* em folhas de repolho e *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* em tubérculos de batata.

Na imunofluorescência, o anticorpo é conjugado com uma sonda fluorescente, geralmente isotiocianato de fluoresceína –

fluorescein isothiocyanate (FITC), a qual pode ser visualizada em lâminas, em microscópio de fluorescência, devidamente equipado e apropriado. Células de *X. axonopodis* pv. *phaseoli* e *X. axonopodis* pv. *malvacearum* foram identificadas por esta técnica em sementes de feijão e algodão. O sucesso desse método, bem como o teste ELISA, depende da especificidade dos anticorpos, que devem ser testados antes de serem usados e que, preferencialmente, não ocorram reações cruzadas com outras bactérias presentes na amostra. A sensibilidade do método permite a detecção de 10^3 UFC/mL e oferece ainda a possibilidade de estudar a morfologia das células em combinação com reações sorológicas⁸.

A amplificação de uma parte específica do DNA do genoma da bactéria de interesse por meio da PCR, utilizando *primers* específicos, caracteriza-se como um método rápido, sensível, preciso e específico de detecção e identificação de bactérias fitopatogênicas, mesmo quando presentes em pequenas quantidades e associadas à alta população saprofítica. Outros métodos derivados da técnica, como a Bio-PCR desenvolvida por Schaad et al. (1995), que consiste na análise das colônias bacterianas primeiramente obtidas em meio seletivo, são utilizados com sucesso na detecção.

Como vantagem, a técnica de Bio-PCR permite a identificação mais rápida das colônias suspeitas, obtidas nos meios seletivos, do que quando se utilizam os testes bioquímicos ou a inoculação em planta hospedeira. Em relação a PCR convencional, as vantagens são as mesmas mencionadas no tópico anterior.

Como desvantagem, as técnicas sorológicas e de PCR não fornecem informações sobre a viabilidade dos patógenos, exceto a Bio-PCR, quando amostras naturais são usadas; também não permitem a detecção de bactérias diretamente nos extratos de sementes, por causa da presença de substâncias inibidoras da reação, e não são quantitativas.

Recentemente, o uso de sondas fluorescentes e em combinação com o citômetro de fluxo surgiu como método rápido, preciso e sensível para detectar e avaliar a viabilidade de microrganismos.

Sonda fluorescente é um fluorocromo capaz de localizar uma região específica em uma amostra biológica ou de responder a um estímulo específico. Essas sondas têm a habilidade de explorar diferentes propriedades da célula, tais como: atividade enzimática, permeabilidade da membrana citoplasmática, potencial da membrana citoplasmática, atividade respiratória, conteúdo relativo de DNA e gradiente de pH. Existe um grande número de sondas fluorescentes que podem ser utilizadas para detectar e avaliar a viabilidade de microrganismos. As mais utilizadas estão descritas no Quadro 2.

O sucesso da técnica na avaliação da viabilidade e detecção de *Clavibacter michiganensis* ssp. *michiganensis*, *X. campestris* pv. *campestris* e *X. axonopodis* pv. *phaseoli* foi relatado por Chitarra et al. (2006) e Tebaldi (2005) em sementes de tomate, brássicas e feijão.

Embora seja uma técnica relativamente nova, o uso de sondas fluorescentes, em combinação com o citômetro de fluxo, apresenta grande potencial. Deve ser explorado na fitopatologia, particularmente na bacteriologia, em que os métodos de detecção e avaliação da viabilidade apresentam limitações, pois a técnica permite obter informações quantitativas sobre o número total de células presentes na amostra, bem como a porcentagem de células viáveis, em milhares de células analisadas num curto período.

Diversas são as técnicas disponíveis para a detecção de bactérias em sementes, ficando a critério de cada laboratório a escolha da mais adequada ao patossistema analisado e às condições disponíveis para a execução dos trabalhos. Ressalta-se que, em muitos casos, é necessária a aplicação de mais de uma técnica para alcançar um diagnóstico preciso.

⁸UFC - Unidade formadora de colônia.

QUADRO 2 - Sondas fluorescentes mais usadas em combinação com o citômetro de fluxo para detectar e avaliar a viabilidade de microrganismos

Atividade enzimática	Potencial de membrana	Ácido nucleico	Imunorreagente
FDA	Rh 123	PI	FITC
cFDA	BOX	DAPI	
cF	DiBAC ₄ (3)	Sytox Green	
cFSE		EB	
Calcein AM		Syto 9	
ChemChrome B			
BCECF-AM			
DiOC ₆ (3)			

FONTES: Tebaldi (2005).

NOTA: FDA - fluorescein diacetate; cFDA - 5-(and 6-) carboxyfluorescein diacetate; cF - carboxyfluorescein; cFSE - 5-(and 6-)carboxyfluorescein succinimidyl ester; Calcein AM - calcein acetoxymethyl ester; BCECF-AM - 2',7'-bis-(2-carboxyethyl)-5(6)-carboxyfluorescein acetoxymethyl ester; DiOC₆(3) - 3,3'-dihexyloxycarbocyanine iodide; Rh 123 - rhodamine 123; BOX - bisoxonol; DiBAC₄(3) - bis-(1,3-dibutylbarbituric acid) trimethine oxonol; PI - propidium iodide; DAPI - 4',6-diamidino-2-phenylindole; EB - ethidium bromide; FITC - fluorescein isothiocyanate.

DETECÇÃO MOLECULAR DE VÍRUS EM SEMENTES

Ao contrário de outras doenças causadas por patógenos como fungos, bactérias e nematoides, as viroses são de mais difícil controle, por não existir um produto químico capaz de interromper ou mesmo impedir o desenvolvimento da doença na planta. Assim, as medidas de controle devem ser de caráter preventivo, visando impedir ou retardar o máximo possível a chegada do vírus na planta. Nesse contexto, o uso de unidades propagativas, constituídas por sementes verdadeiras ou partes da planta, como bulbos, borbulhas, tubérculos e outros, comprovadamente livres de vírus, é de grande importância e representa o princípio básico que deve ser observado para evitar uma epidemia no campo.

A determinação da sanidade das unidades propagativas requer o uso de técnicas de diagnose sensíveis, eficientes e de alta repetibilidade, que não ofereçam margens às dúvidas, pois o descarte de um lote de sementes tem várias implicações econômicas e sociais, onde o produtor é o principal

alvo, de modo que uma decisão equivocada pode trazer consequências desastrosas para todo o sistema de defesa fitossanitária envolvido.

Quando comparadas às outras unidades propagativas, a detecção de vírus nas sementes verdadeiras é bem mais difícil, por uma série de motivos. O primeiro deles está relacionado com a concentração de partículas virais nas sementes, que é geralmente baixa, exigindo o emprego de métodos de alta sensibilidade. A escassez de partículas, aliada ao seu tamanho, torna a sua visualização direta ao microscópio eletrônico praticamente impossível. Além disso, os vírus nem sempre induzem sintomas visíveis a olho nu nas sementes e, quando esses sintomas estão presentes, na maioria das vezes não estão correlacionados com a sua transmissão. Finalmente, a porcentagem de transmissão dos vírus pelas sementes é, de modo geral, baixa e bastante variável, pois diversos fatores podem influenciar na proporção de sementes infectadas produzidas por uma planta doente, como o vírus, a estirpe e a própria planta hospedeira.

Desse modo, a escolha do método a ser empregado para diagnose dos vírus em sementes depende de uma série de eventos, como o número de amostras a ser analisado, o tipo de vírus e a sua provável concentração nas sementes e a infraestrutura do laboratório que irá processar as análises. Até os anos 80, as opções de escolha eram bastante limitadas, e tinham como método mais sofisticado o sorológico ELISA que foi desenvolvido por Clark e Adams (1977), na sua primeira versão *double antibody sandwich* (DAS). Apesar de ser um método bastante sensível e de fácil aplicabilidade, possui como limitação o fato de não poder ser aplicado para discriminar estirpes virais estreitamente relacionadas nem para viroides, uma vez que esses não possuem capa proteica para atuar como antígeno.

Com a evolução das técnicas de manipulação e estudo de ácidos nucleicos, na Biologia Molecular, surgiu a técnica de hibridização com cDNA e, pouco tempo depois, a de PCR e *reverse transcription-PCR* (RT-PCR), para vírus, cujo ácido nucleico é o ácido ribonucleico (RNA).

Hibridização com ácido nucleico complementar

A hibridização com cDNA foi desenvolvida pela necessidade de encontrar uma técnica eficiente para a detecção do *Potato spindle tuber viroid*. Pouco depois, tornou-se popular também para a detecção de diversos vírus em plantas, sendo empregada tanto para vírus de DNA, com fita simples ou dupla, como para vírus de RNA.

Seu processamento baseia-se na fixação do ácido nucleico, extraído da planta ou da parte da planta que se quer analisar, em um suporte sólido, geralmente uma membrana de náilon ou de nitrocelulose, colocando-a em contato com a sonda que contém a sequência de bases complementares a um segmento genômico específico, que caracteriza o patógeno que se quer identificar. O único problema é que essa reação de hibridização não pode ser identificada, se não houver a incorporação de

um agente marcador na sonda empregada. Embora sondas de cRNA e de cDNA possam ser empregadas, as de cDNA são as preferidas, porque os híbridos RNA/DNA são mais estáveis.

Os primeiros marcadores empregados foram do tipo isótopos radioativos (fósforo radioativo – ^{32}P) ou enxofre radioativo – ^{35}S), o que constitui uma limitação, pois, além do perigo que uma exposição constante a material radioativo proporciona, poucos laboratórios são equipados e licenciados para trabalhar com radioatividade no Brasil.

O desenvolvimento de marcadores não radioativos, como a biotina e a digoxigenina, abriu novas perspectivas para a popularização dessa técnica. A maior dificuldade foi encontrada na mão-de-obra qualificada geralmente exigida para a realização da técnica, e na ocorrência de falsos-positivos. Figueira, Domier e Darcy (1997) conseguiram simplificar a técnica de hibridização, utilizando sondas marcadas com biotina, diminuindo o seu tempo de processamento e eliminando os falso-positivos na detecção do *Barley yellow dwarf virus* (BYDV) - PAV-IL.

A sensibilidade dessa técnica varia com o tipo de vírus que se quer identificar, o tipo de sonda e o conjunto de enzimas e substratos empregados. Borja e Ponz (1992) detectaram *Cherry leafroll virus* em 160 μg de tecido infectado e em menos de 1 ng de RNA viral purificado, utilizando sondas cromogênicas, e, em 30 μg de tecidos e 250 pg de vírus purificado, quando utilizou sondas quimioluminescentes. Figueira, Domier e Darcy (1997) detectaram o BYDV em 12,5 a 50 ng de tecidos infectados e 0,5 a 2 ng de vírus purificado. Maior sensibilidade foi encontrada por Hu e Wong (1998), que detectaram 50 pg de *Cymbidium mosaic virus* e 250 pg de *Odontoglossum ringspot virus*, respectivamente⁹. Mesmo constatada a sensibili-

dade, essas técnicas não têm sido muito empregadas para diagnose de vírus em sementes verdadeiras, sendo a sorológica ELISA bem mais popular e mais utilizada em testes de rotina.

PCR e RT-PCR

Dentre as técnicas moleculares a PCR (para vírus de DNA) e a RT-PCR são as mais populares, pela sensibilidade, especificidade e facilidade de realização em laboratório. Desde a implementação dessas técnicas, no final da década de 80, têm sido intensivamente empregadas para diagnose de vírus e de viroides e também para distinção entre estirpes estreitamente relacionadas. Essas técnicas baseiam-se no uso de um par de oligonucleotídeos complementares a uma dada região do genoma viral, que são desenhados para gerar um fragmento de DNA de tamanho pré-determinado, com o auxílio de uma enzima termoestável, como a Taq DNA polimerase. Quando o vírus é de RNA, a reação de PCR é feita com o DNA complementar ao RNA viral (RT-PCR), obtido com o auxílio de uma transcriptase reversa.

Diversas variações dessas técnicas têm sido empregadas. Dentre elas podem ser citadas: *nested PCR*, *multiplex PCR*, *fluorescence RT-PCR* e *competitive fluorescent PCR* e combinações com outras técnicas como *immuno capture PCR* e RFLP.

Nested PCR

Essa técnica geralmente é empregada, quando o vírus encontra-se em baixas concentrações na planta ou quando inibidores da DNA polimerase podem estar presentes nos tecidos vegetais a serem analisados. Nesse caso, a PCR é realizada em duas etapas. Na primeira, geralmente empregam-se oligonucleotídeos degenerados ou randômicos, para aumentar a primeira reação de PCR, e, na segunda, emprega-se uma alíquota do DNA obtido para a segunda amplificação.

Multiplex PCR

O objetivo do *multiplex PCR* é detectar diferentes espécies de vírus ou estirpes do mesmo vírus em uma única reação. No caso do *Potato virus Y* (PVY), por exemplo, diversas estirpes e variantes genéticas de uma mesma estirpe podem ocorrer simultaneamente, de modo que o *multiplex PCR* torne-se uma importante alternativa que permita a detecção de mais de uma estirpe/variante numa mesma reação.

RT-PCR fluorescente

Nesse caso, dois oligonucleotídeos flanqueiam a sequência de interesse e um terceiro oligonucleotídeo com marcação fluorescente se anela entre eles. Quando os dois primeiros oligonucleotídeos são estendidos pela DNA polimerase, o terceiro é liberado e a fluorescência ocorre. Uma variação desse método é a PCR competitiva, na qual se utilizam diversos pares de oligonucleotídeos com diferentes marcadores fluorescentes, para detectar infecções múltiplas, com diferentes espécies/estirpes de vírus.

IC-RT-PCR

A técnica de RT-PCR com imunocaptura (*immunocapture-RT-PCR*), para vírus de RNA, e IC-PCR, para vírus de DNA, combina a captura do vírus pelo antissoro específico, que pode ser policlonal, com a técnica PCR. Para isso são empregados microtubos especiais, com capacidade de adsorver as moléculas do anticorpo, da mesma forma que ocorre nas microplacas empregadas para o teste ELISA. Inicialmente é feita a cobertura dos tubos com o anticorpo específico e depois o extrato clarificado da planta é então adicionado a esse tubo, que é incubado por um período apropriado, para que as partículas virais sejam capturadas. Após a eliminação do extrato foliar e a lavagem, inicia-se a transcrição reversa e, em seguida, a amplificação do genoma viral, que é feita no

⁹ μg – Micrograma; ng – Nanograma; pg – Picograma.

mesmo tubo (IC-RT-PCR). Quando o vírus tem como ácido nucleico o DNA, após a captura das partículas, a reação de PCR já pode ser realizada (IC-PCR). Basta adicionar a estes os componentes da reação, que incluem os *primers* também específicos, a enzima Taq DNA polimerase etc. Esses tubos são apropriados para ser colocados diretamente no termociclador para o processo de amplificação. Pode-se empregar mais de um tipo de antissoro ao mesmo tempo, seguido da utilização de mais de um par de *primers*, o que possibilita a detecção de diversos vírus na mesma reação (*multiplex immunocapture* RT-PCR ou PCR). Essa técnica tem sido considerada como bastante sensível, além de evitar a ocorrência de falso-positivos.

RFLP

Trata-se também de uma combinação de técnicas, em que o produto da PCR é submetido a enzimas de restrição, o que permite detectar pequenas diferenças na sequência genômica de isolados virais distintos, pela obtenção de fragmentos de DNA de diferentes tamanhos.

Microarranjos

Apesar de não serem muito utilizados, os microarranjos têm-se tornado bastante populares. Alguns autores têm destacado as vantagens de seu uso na diagnose de vírus (BYSTRICA et al., 2005; BOONHAM; TOMLINSON; MUMFORD, 2007; ABDULLAHI; ROTT, 2009). Nessa técnica, o RNA é extraído da planta sadia (controle) e da doente, transcrito em cDNA incorporando nucleotídeos marcados com fluorescência (Cy 3 para a planta sadia e Cy 5 para o material em teste). O cDNA é incorporado e hibridizado ao arranjo (previamente disposto em um suporte de vidro, membrana ou polímero). Após a hibridização, esse suporte é lavado e escaneado para detectar os pontos onde ocorreu a hibridização.

Outras técnicas modernas

Com o avanço das técnicas modernas em Biologia Molecular, já se fala na pró-

xima geração de sequenciamento genético, acoplada à metagenômica, como uma nova ferramenta com potencial para a diagnose de vírus (ADAMS et al., 2009). Certamente, novas outras técnicas surgirão, em atendimento à demanda crescente de alimentos e à necessidade de controle gerada pela intensa circulação de materiais vegetais entre países, ocasionando um constante risco de veiculação e introdução de patógenos indesejáveis.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O avanço da ciência tem permitido o desenvolvimento constante de novas técnicas ou combinações de técnicas que visam à identificação e à caracterização de patógenos em vários níveis taxonômicos. Como é do conhecimento de todos, a sanidade das sementes e das partes propagativas das plantas é um fator fundamental para evitar a disseminação de patógenos e a sua introdução em áreas livres de doenças. Portanto, a aplicação das técnicas moleculares na Patologia de Sementes representa um forte impulso para essa área do conhecimento e com possibilidades ilimitadas de crescimento.

REFERÊNCIAS

ABDULLAHI, I.; ROTT, M. Microarray immunoassay for the detection of grapevine and tree fruit viruses. *Journal of Virological Methods*, v.160, n.1/2, p.90-100, Sept. 2009.

ADAMS, I.P. et al. Next-generation sequencing and metagenomic analysis: a universal diagnostic tool in plant virology. *Molecular Plant Pathology*, v.10, n.4, p.537-545, Jul. 2009.

BARROCAS, E.N. *Efeitos de Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* em sementes e plantas de algodoeiro e detecção, por meio de PCR, de *Stenocarpella* sp. em sementes de milho inoculadas. 2008. 110p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2008.

BOONHAM, N.; TOMLINSON, J.; MUMFORD, R. Microarrays for rapid identification of plant viruses. *The Annual Review of Phytopathology*, v.45, p.307-328, Sept. 2007.

BORJA, M.J.; PONZ, F. An appraisal of different methods for the detection of *Cherry leafroll virus*. *Journal of Virological Methods*, v.36, n.1, p.73-83, Jan. 1992.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária E Abastecimento. **Manual de análise sanitária de sementes**. Brasília, 2009. 200p.

BYSTRICKA, D. et al. Oligonucleotide-based microarray: a new improvement in microarray detection of plant viruses. *Journal of Virological Methods*, v.128, n.1/2, p.176-182, Sept. 2005.

CHADHA, S.; GOPALAKRISHNA, T. Detection of *Magnaporthe grisea* in infested rice seed using polymerase chain reaction. *Journal of Applied Microbiology*, v.100, n.5, p.1147-1153, May 2006.

CHILVERS, M.I. et al. A real-time, quantitative PCR assay for *Botrytis* spp. that cause neck rot of onion. *Plant Disease*, St. Paul, v.91, n.5, p.599-608, May 2007.

CHITARRA, L. G. et al. The use of fluorescent probes to assess viability of the plant pathogenic bacterium *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* by flow cytometry. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v.31, n.4, p.349-356, jul./ago. 2006.

CLARK, M.F.; ADAMS, A.N. Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *Journal of General Virology*, v.34, n.3, p.475-483, 1977.

CONSOLO, V.F. et al. A conventional PCR technique to detect *Septoria tritici* in wheat seeds. *Australasian Plant Pathology*, v.38, n.3, p. 222-227, Apr. 2009.

DOMBROWSKI, J.E. et al. A sensitive PCR-based assay to detect *Neotyphodium* fungi in seed and plant tissue of tall fescue and ryegrass species. *Crop Science*, Madison, v.46, n.3, p.1064-1070, 2006.

FIGUEIRA, A.R.; DOMIER, L.L.; D'ARCY, C.J. Comparison of techniques for detection of *Barley yellow dwarf virus-PAV-IL*. *Plant Disease*, v.81, n.11, p.1236-1240, Nov. 1997.

HU, W.W.; WONG, S.M. The use of DIG-labelled cRNA probes for the detection of *Cymbidium mosaic potyvirus* (CymMV) and *Odontoglossum ringspot tobamovirus* (ORSV) in orchids. *Journal of Virological Methods*, v.70, n.2, p.193-199, 1998.

IOOS, R. et al. Development of a PCR test

to detect the downy mildew causal agent *Plasmopara halstedii* in sunflower seeds. **Plant Pathology**, St. Paul, v.56, n.2, p.209-218, Apr. 2007.

IOOS, R. et al. Sensitive detection of *Fusarium circinatum* in pine seed by combining an enrichment procedure with a real-time polymerase chain reaction using dual-labeled probe chemistry. **Phytopathology**, St. Paul, v.99, n.5, p.582-590, May 2009.

JUSTESEN, A.F.; HANSEN, H.J.; PINNSCHMIDT, H.O. Quantification of *Pyrenophora graminea* in barley seed using real-time PCR. **European Journal of Plant Pathology**, v.122, n.2, p.253-263, 2008.

OLIVEIRA, J.R.; MOURA, A.B.; SOUZA, R.M. Transmissão e controle de fitobactérias em sementes. In: ZAMBOLIN, L. **Sementes: qualidade fitossanitária**. Viçosa, MG: UFV, 2005. p.113-134.

PASQUALI, M. et al. Development of a real-time polymerase chain reaction for the detection of *Fusarium oxysporum* f. sp. *basilici* from basil seed roots. **Journal of Phytopathology**, v.154, n.10, p.632-636, Oct. 2006.

RÍOS, M.O.; FERNÁNDEZ, P.; CARMONA, M. Detection of *Rhynchosporium secalis* in barley seeds from Argentina through polymerase chain reaction technique. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.32, n.5, p.415-418, set./out. 2007.

SCHAAD, N.W. et al. A combined biological and enzymatic amplification (Bio-PCR) technique to detect *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* in bean seed extracts. **Phytopathology**, St. Paul, v.85, n.2, p.243-248, 1995.

TEBALDI, N. D. **Deteção de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* em sementes de feijão e aspectos epidemiológicos do crescimento bacteriano comum**. 2005. 102p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2005.

TRUJILLO, G.; SAETTLER, A.W. A combined semi-selective medium and serology test for the detection of *Xanthomonas* blight bacteria in bean seed. **Journal of Seed Technology**, v.4, n.1, p.35-41, 1979.

VECHIATO, M.H.; MARINGONI, A.C.; MARTINS, E.M.F. Desenvolvimento de iniciadores para detecção e identificação de *Diaporthe phaseolorum* var. *meridionalis* em sementes de soja. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v.32, n.2, p.161-169, Apr./June 2006.

Veja no próximo

INFORME AGROPECUÁRIO

Tecnologias para a agricultura familiar: produção vegetal

- Plano de negócios para a agricultura familiar
- Manejo da fertilidade do solo no agroecossistema
- Insumos alternativos para o controle de pragas e doenças
- Produção de arroz, milho, feijão e hortaliças na agricultura familiar
- Seringueira: alternativa para geração de renda
- Produção de alimentos na agroindústria familiar com foco na higiene

Leia e Assine o INFORME AGROPECUÁRIO
(31) 3489-5002 - publicacao@epamig.br