



FIP 320 - DIAGNOSE E CONTROLE DE DOENÇAS DE PLANTAS

DIAGNOSE E CONTROLE DE VIROSES VEGETAIS

Leitura recomendada:

Introdução à Virologia Vegetal (Caderno Didático no. 87), capítulos 10 e 11

1. Diagnóstico no campo

- a. observação e histórico detalhados da área
- b. distribuição das plantas sintomáticas no campo
- c. observação dos sintomas
- d. coleta e envio do material para diagnóstico

2. Diagnóstico na casa-de-vegetação

- a. plantas indicadoras
- b. inoculação via extrato vegetal tamponado
- c. observação e análise dos resultados (comparação com dados da literatura)
- d. principais fontes de referência para gama de hospedeiros e sintomas induzidos por vírus de plantas

3. Diagnóstico no laboratório

I. Sorologia

- a. noções básicas
- b. principais métodos sorológicos
- c. execução de um teste de ELISA
- d. análise e interpretação dos resultados

II. Métodos moleculares

- a. noções básicas
- b. montagem de um teste de PCR
- c. análise e interpretação dos resultados

4. Controle

- a. eliminação das fontes de inóculo
- b. uso de material propagativo sadio
- c. controle do vetor
- d. resistência dos hospedeiro

PRINCIPAIS VIROSES DO TOMATEIRO

Mais de 50 espécies de vírus são capazes de infectar o tomateiro. Abaixo estão listadas as características gerais das espécies de ocorrência mais frequente no Brasil.

Doença	Agente etiológico	Família/Gênero	Transmissão	Sintomas em tomateiro	Espécies indicadoras	Relacionamento sorológico com outros vírus	Variedades resistentes
Mosaico rugoso/dourado	ToRMV ToCMV TYVSV TGMV outros	<i>Geminiviridae/</i> <i>Begomovirus</i> (todos)	mosca-branca (circulativo não-propagativo)	mosaico amarelo, rugosidade foliar, mosaico de nervuras, enrolamento das folhas	<i>N. benthamiana</i> , <i>N. glutinosa</i> (mosaico severo e deformação foliar)	sem informações	alguns híbridos comerciais são tolerantes
Vira-cabeça	TSWV TCSV GRSV	<i>Bunyaviridae/</i> <i>Tospovirus</i> (todos)	tripes (propagativo)	pontuações necróticas e arroxamento do terço superior da planta, que se curva para baixo	<i>N. clevelandii</i> , <i>Petunia hybrida</i> (lesões locais)	os três vírus possuem relacionamento sorológico entre si	o gene <i>Sw-5</i> confere resistência às três espécies
Estriado, “risca”	PVY, PepYMV	<i>Potyviridae/</i> <i>Potyvirus</i> (ambos)	afídeos (não- circulativo)	mosaico severo e epinastia	<i>N. glutinosa</i> (mosqueado)	PVY e PepYMV são relacionados sorologicamente	não existem
Mosaico comum	ToMV	<i>-/Tobamovirus</i>	contato mecânico, semente	mosaico, cordão de sapato, necrose	<i>Nicotiana glutinosa</i> , <i>N. tabacum</i> ‘Havana’ (lesões locais necróticas)	TMV	a maioria dos híbridos comerciais é resistente

(cont.)

Topo amarelo	TYTV	<i>Luteoviridae/ Luteovirus</i>	afídeos (circulativo não- propagativo)	amarelecimento intenso no terço superior da planta	não é transmitido via extrato vegetal tamponado	sem informações	não existem
Mosaico	PVX	<i>-/Potexvirus</i>	contato mecânico	mosqueado leve	<i>Gomphrena globosa</i> (losão local com borda arroxeadada)	não há	não existem
Mosaico	CMV	<i>Bromoviridae/ Cucumovirus</i>	afídeos (não- circulativo)	varia muito com a estirpe, desde mosqueado leve até mosaico e distorção foliar acentuados, incluindo cordão-de- sapato	<i>Cucurbita pepo</i> 'Caserta' (mosaico)	não há	não existem

PRINCIPAIS VIROSES DAS CUCURBITÁCEAS

Mais de 30 espécies de vírus já foram relatadas infectando espécies de cucurbitáceas. Abaixo estão listadas as características gerais das espécies de ocorrência mais frequente no Brasil.

Doença	Agente etiológico	Família/Gênero	Transmissão	Sintomas em abobrinha de moita	Hospedeiros indicadores	Relacionamento sorológico com outros vírus	Variedades resistentes
Mosaico	CMV	<i>Bromoviridae/ Cucumovirus</i>	afídeos (não-circulativo)	mosaico e deformação foliar	não existem espécies que diferenciem de outros vírus que infectam cucurbitáceas	não há	não existem
	SqMV	<i>Comoviridae/ Comovirus</i>	besouros crisomelídeos, semente	mosaico e deformação foliar	<i>Cucumis metuliferus</i> (lesões locais)	não há	não existem
	PRSV-W	<i>Potyviridae/ Potyvirus</i>	afídeos (não-circulativo)	mosaico e deformação foliar	<i>Cucumis metuliferus</i> (mosqueado ou mosaico)	espécies de potyvírus, incluindo WMV-2 e ZYMV	alguns híbridos de meloeiro são resistentes
	WMV-2	<i>Potyviridae/ Potyvirus</i>	afídeos (não-circulativo)	mosaico e deformação foliar	<i>N. benthamiana</i> (mosaico)	espécies de potyvírus, incluindo PRSV e ZYMV	não existem
	ZYMV	<i>Potyviridae/ Potyvirus</i>	afídeos (não-circulativo)	mosaico severo, deformação foliar acentuada	<i>Luffa acutangula</i> (mosaico) <i>Gomphrena globosa</i> (lesões locais)	espécies de potyvírus, incluindo PRSV e WMV-2	não existem
Vira-cabeça	ZLCV	<i>Bunyaviridae/ Tospovirus</i>	tripes (propagativo)			espécies de tospovírus	não existem

PRINCIPAIS VIROSES DO MARACUJAZEIRO

Doença	Agente etiológico	Família/Gênero	Transmissão	Sintomas em maracujá-amarelo	Hospedeiros indicadores	Relacionamento sorológico com outros vírus	Variedades resistentes
Endurecimento dos frutos	CABMV, PWV	<i>Potyviridae</i> / <i>Potyvirus</i> (ambos)	afídeos (não circulativo)	mosaico, distorção foliar, endurecimento do pericarpo dos frutos	<i>Phaseolus vulgaris</i> (mosaico) <i>Vigna unguiculata</i> (mosaico)	outras espécies de potyvírus; o CABMV e o PWV são relacionados sorologicamente	não existem
Mosaico	CMV	<i>Bromoviridae</i> / <i>Cucumovirus</i>	afídeos (não circulativo)	mosaico amarelo	<i>Cucurbita pepo</i> ‘Caserta’ (mosaico)	não há	não existem
Pinta verde	PGSV	<i>Rhabdoviridae</i> / ?	ácaros (propagativo)	manchas verdes em folhas (após a senescência) e frutos (após o amadurecimento)	não é transmitido via extrato vegetal tamponado	sem informações	não existem

PRINCIPAIS VIROSES DO FEJJOEIRO

Mais de 30 espécies de vírus já foram relatadas infectando o feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris*). Abaixo estão listadas as características gerais das espécies de ocorrência mais frequente no Brasil.

Doença	Agente etiológico	Família/Gênero	Transmissão	Sintomas em feijoeiro	Hospedeiros indicadores	Relacionamento sorológico com outros vírus	Variedades resistentes
Mosaico comum	BCMV BCMNV	<i>Potyviridae/ Potyvirus</i>	afídeos, não-circulativo e pela semente	mosaico, bolhosidade, necrose sistêmica (BCMNV em cultivares com o gene de resistência <i>I</i>)	feijoeiro (mosaico), <i>Nicotiana clevelandii</i> (mosqueado)	relacionado sorologicamente ao BYMV e outros potyvírus, como PVY e SMV	a maioria das cultivares brasileiras é resistente (genes <i>I, bc3</i>)
Mosaico dourado	BGMV	<i>Geminiviridae/ Begomovirus</i>	mosca-branca, circulativo não-propagativo	mosaico amarelo intenso, epinastia, encurtamento dos entre-nós	feijoeiro (mosaico); o BGMV <u>não é</u> transmitido via extrato vegetal tamponado	relacionado sorologicamente a outras espécies de begomovírus	Ônix, Iapar 57 e Iapar 72 são tolerantes
Mosaico em desenho (mosaico rugoso)	BRMV	<i>Comoviridae/ Comovirus</i>	besouros crisomelídeos	faixas ao longo das nervuras formando um desenho simétrico, mosaico, rugosidade, enrolamento das vagens	feijoeiro (mosaico, enrolamento de vagens ou lesões locais, dependendo da cultivar), <i>Chenopodium amaranticolor</i> (lesões locais)	relacionamento sorológico distante com outras espécies de comovírus	Carioca, Aeté 1/37, Aeté 1/38 e Jalo possuem bom nível de resistência
Mosaico amarelo	BYMV	<i>Potyviridae/ Potyvirus</i>	afídeos, não-circulativo	mosaico amarelo, normalmente sem distorção foliar	ervilha (mosaico), <i>Chenopodium quinoa</i> (lesões locais)	relacionado sorologicamente ao BCMV, CABMV, PWV	o gene <i>By-2</i> confere resistência



FIP 320 - DIAGNOSE E CONTROLE DE DOENÇAS DE PLANTAS

DETERMINAÇÃO DA GAMA DE HOSPEDEIROS DE UM VÍRUS

A gama de hospedeiros é uma das características básicas dos vírus de plantas. Diferenças na gama de hospedeiros podem distinguir não apenas espécies de vírus, mas também estirpes da mesma espécie. A gama de hospedeiros pode ser utilizada para a identificação de um vírus desconhecido, comparando-se os resultados do teste com as informações disponíveis na literatura. Em alguns casos, novas espécies ou estirpes de vírus podem ser descritas com base em diferenças na gama de hospedeiros.

O teste avalia dois parâmetros: as espécies que são hospedeiras do vírus (tanto as que apresentam sintomas como as que apresentam infecção latente), e os sintomas induzidos pelo vírus em cada hospedeiro (locais e sistêmicos). As espécies de plantas incluídas em um teste de gama de hospedeiros incluem as indicadoras mais comumente usadas em virologia vegetal, além de plantas específicas para o vírus em questão (por exemplo, pode-se utilizar diversas cultivares de tomateiro quando o vírus em questão infectar tomateiro).

As principais vantagens do teste de gama de hospedeiros incluem seu custo reduzido e sua execução extremamente simples. É também um teste bastante sensível, embora isso dependa das características do vírus em estudo. Suas principais desvantagens incluem o tempo necessário para avaliação dos resultados (no mínimo duas semanas, frequentemente chegando a 4-5 semanas) e a variabilidade nos resultados em função de condições ambientais e estado fisiológico das plantas inoculadas. Além disso, exige espaço considerável em casa-de-vegetação e pode ser trabalhoso no caso de vírus que não são transmitidos via extrato vegetal tamponado (ver abaixo).

Modos de transmissão

A enxertia constitui o meio garantido de transmitir um vírus de uma planta a outras. Porém, os seus resultados demoram e é impossível enxertar espécies botanicamente não relacionadas. O uso do inseto vetor é uma alternativa muitas vezes utilizada. A transmissão via extrato vegetal tamponado (transmissão mecânica) é muito mais simples e rápida do que a enxertia ou do que o uso do inseto vetor. Diversos vírus de plantas são transmissíveis mecanicamente, incluindo os tobamovírus, potyvírus, cucumovírus e tospovírus, e alguns geminivírus (TYLCV, BGYMV). Entretanto, outros vírus de grande importância econômica não são transmitidos dessa forma, incluindo os luteovírus, closterovírus e vários geminivírus (BGMV, ToRMV). A impossibilidade de se transmitir um vírus mecanicamente está provavelmente associada à infecção viral restrita às células do floema. Uma vez que durante a inoculação mecânica atinge-se basicamente células da epiderme e do parênquima paliçádico, vírus restritos ao floema não serão capazes de estabelecer uma infecção sistêmica.

Alguns cuidados básicos devem ser tomados para que um vírus seja transmitido com sucesso via extrato vegetal. Em primeiro lugar, é essencial que o pH do extrato seja mantido próximo ao ótimo para a estabilidade da partícula viral. Esse pH ótimo é próximo ao neutro para a maioria dos vírus de plantas. É também necessário minimizar a atividade de enzimas oxidativas e de compostos fenólicos, que podem desestabilizar a partícula viral devido à modificações na proteína do capsídeo. A utilização de uma solução tampão contendo agentes redutores ou quelantes é a forma mais comumente encontrada para satisfazer esses requisitos. Os tampões de fosfato são os mais empregados para transmissão mecânica, por serem relativamente inertes e não causarem efeitos deletérios às partículas virais. Entre os agentes redutores e quelantes mais comumente usados pode-se citar o sulfito de sódio, β -mercaptoetanol, EDTA, PVP ou dietilditiocarbamato de sódio (Na-DIECA). Uma vez preparado o extrato vegetal, esse deve ser rapidamente utilizado para a inoculação, pois mesmo com os cuidados acima citados, a sobrevivência do vírus no extrato é limitada. Finalmente, deve-se assegurar que as células vegetais permitirão a entrada das partículas virais. Em outras palavras, deve-se provocar ferimentos nas células, mas impedindo que essas morram, pois células mortas não permitirão a replicação viral. Esse objetivo é atingido pelo uso de um abrasivo, como o óxido de alumínio, normalmente denominado Carborundum 600 (600 mesh). Esse abrasivo deve ser pulverizado sobre as folhas a serem inoculadas, ou pode ser misturado ao extrato vegetal tamponado (o que é mais prático quando o número de plantas a serem inoculadas é muito grande).

Todos os cuidados acima citados devem ser redobrados quando a planta a partir da qual o extrato é preparado contém altas concentrações de compostos fenólicos e/ou oxidativos (p. ex.: tomateiro, pimentão, plantas lenhosas, plantas daninhas). A transmissão mecânica pode ser de baixa eficiência nesses casos.

Identificação viral baseada na gama de hospedeiros

Isolados virais coletados no campo podem ser tentativamente identificados com base em suas respectivas gamas de hospedeiros. Nesse tipo de teste é fundamental a utilização de testemunhas inoculadas apenas com a solução tampão utilizada para macerar as folhas infectadas. As plantas inoculadas com o tampão são especialmente importantes, pois permitem que se diferencie sintomas de infecção viral da injúria freqüentemente causada pela inoculação mecânica.

PRÁTICA

Materiais:

- . tampão de fosfato de potássio, 0,1 M, pH 7,2, contendo Na₂SO₃, a frio (2 a 5⁰C)
- . almofariz de porcelana e pilão recentemente retirados do congelador
- . gaze
- . carborundum, 600 mesh
- . espécies a serem inoculadas:
Chenopodium amaranticolor, *Chenopodium quinoa*, *Lycopersicon esculentum*, *Nicotiana glutinosa*, *N. rustica*, *Phaseolus vulgaris*.

Procedimento:

- . marcar ANTES da inoculação o vaso ou lote de vasos com etiquetas, indicando a espécie vegetal sendo inoculada, o inoculador e a data
- . polvilhar Carborundum 600 nas folhas a serem inoculadas
- . macerar a folha infectada no almofariz, na presença do tampão, numa proporção aproximada de 1:5 (peso da folha:volume de solução tampão)
- . a gaze molhada no inóculo deve ser corrida sem pressão na folha, minimizando a injúria aos tecidos e células
- . as plantas inoculadas devem ser mantidas em casa-de-vegetação; o surgimento dos sintomas deve ser observado periodicamente (pois muitas vezes o sintoma se modifica com o passar do tempo), a partir de três dias após a inoculação (lesões locais podem surgir em até 48 horas a.i.); anote os sintomas observados nas folhas inoculadas (sintomas locais) e nas folhas não-inoculadas (sintomas sistêmicos), utilizando a tabela na próxima página.

Espécie	1ª semana	2ª semana	3ª semana
<i>Chenopodium amaranticolor</i>			
<i>Chenopodium quinoa</i>			
<i>Lycopersicon esculentum</i>			
<i>N. glutinosa</i>			
<i>N. rustica</i>			
<i>Phaseolus vulgaris</i>			

- assinale os sintomas na forma de uma fração: o numerador corresponde aos sintomas nas folhas inoculadas, e o denominador corresponde aos sintomas nas folhas não-inoculadas; represente os sintomas da seguinte maneira: --, sem sintomas evidentes; am, amarelecimento; cl, clorose; cn, clareamento de nervuras; df, deformação foliar; ef, enrugamento foliar; ep, epinastia; lc, lesão local clorótica; lca, lesão clorótica com contorno anelar; ln, lesão local necrótica; lna, lesão necrótica com anéis concêntricos; lp, "line patterns"; ma, mancha anela; mc, mancha clorótica; m, mosaico; ma, mosaico amarelo; mb, mosaico com bolhas; mq, mosqueado; mt, morte da planta; rc, redução de crescimento

BIBLIOGRAFIAS PARA CONSULTA

1. Adams, M.J., Antoniw, J.F., Barker, H., Jones, A.T., Murant, A.F. & Robinson, D. **Descriptions of Plant Viruses on CD-ROM**. Wellesbourne, Warwick, UK: Association of Applied Biologists. 1998. Versão on-line: <http://www.dpvweb.net/index.php>
2. Série de "Compêndios" de doenças de plantas, publicada pela American Phytopathological Society (APS Press), EUA. Exemplos:
Hooker, W.J. (Ed.) **Compendium of Potato Diseases**. St. Paul, Minnesota, EUA: APS Press. 1981.
Zitter, T.A., Hopkins, D.L. & Thomas, C.E. (Eds). **Compendium of Cucurbit Diseases**. St. Paul, Minnesota, EUA: APS Press. 1996.
3. Brunt, A.A., Crabtree, K., Dallwitz, M.J., Gibbs, A.J., Watson, L. & Zurcher, E.J. **Plant Viruses Online: Descriptions and Lists from the VIDE Database**. <http://image.fs.uidaho.edu/vide/refs.htm>. Versão: 20/08/1996.

**GAMA DE HOSPEDEIROS PARCIAL DE ALGUNS VÍRUS DE OCORRÊNCIA
FREQUENTE EM AMOSTRAS ANALISADAS PELO LVVM/DFP**

Espécie	TMV	CMV	PRSV-W	ZYMV	WMV-2	PVY
<i>Nicotiana tabacum</i> ‘TNN’	lln/-	-/m	-/-	-/-	-/-	-/cn, m
<i>N. tabacum</i> ‘Samsun’	-/m	-/-	-/-	-/-	-/-	-/m
<i>N. tabacum</i> ‘Havana 425’	lln/-	-/m, df	-/-	-/-	-/-	-/mq
<i>N. benthamiana</i>	-/m, mt	-/ma, df	-/-	-/-	-/m	-/mq
<i>N. clevelandii</i>	-/m	-/mq	-/-	-/-	-/-	-/-
<i>N. glutinosa</i>	lln/-	-/mq, m	-/-	-/-	-/-	-/mq
<i>N. debney</i>	-/m	-/-	-/-	-/-	-/-	-/m
<i>N. rustica</i>	-/m	-/m	-/-	-/-	-/-	-/mq
<i>Lycopersicon esculentum</i>	-/m, cs	-/cs	-/-	-/-	-/-	-/m
<i>Capsicum annuum</i>	-/m, df	-/m	-/-	-/-	-/-	-/m
<i>Chenopodium quinoa</i>	-/-	llc/-	llc, lln/-	llc/-	llc/-	llc/-
<i>C. amaranticolor</i>	lln/-	llc/-	llc/-	llc/-	llc/-	llc/-
<i>Gomphrena globosa</i>	-/-	-/-	-/-	llc/-	-/-	-/-
<i>Datura stramonium</i>	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
<i>Phaseolus vulgaris</i>	-/m*	-/m*	-/-	-/-	-/-	-/-

* apenas algumas estirpes desses vírus infectam esse hospedeiro

. os sintomas em folhas inoculadas/não inoculadas estão indicados por: am, amarelecimento; cl, clorose; cn, clareamento de nervuras; cs, cordão-de-sapato (estreitamento do limbo foliar, por vezes restando apenas a nervura central); df, deformação foliar; ef, enrugamento foliar; ep, epinastia; lc, lesão local clorótica; lca, lesão clorótica com contorno anelar; ln, lesão local necrótica; lna, lesão necrótica com anéis concêntricos; lp, “line patterns”; ma, mancha anela; mc, mancha clorótica; m, mosaico; ma, mosaico amarelo; mb, mosaico com bolhas; mq, mosqueado; mt, morte da planta; rc, redução de crescimento; -, sem sintomas evidentes.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE FITOPATOLOGIA
36571-000 Viçosa, MG - Brasil



FIP 320 - DIAGNOSE E CONTROLE DE DOENÇAS DE PLANTAS

ELISA INDIRETO PARA DIAGNOSE DE VIROSES VEGETAIS

Materiais

Placas de poliestireno, 96 cavidades

Anti-soros, soro normal

Conjugado cabra anti-coelho com fosfatase alcalina

Substrato (*p*-nitrofenil-fosfato)

Amostras vegetais para diagnose

Amostras vegetais infectadas (controles positivos)

Tampão de extração: Na₂CO₃/NaHCO₃ (3,18/5,86g), NaN₃ (0,02%), PVP (2%), ovalbumina (0,2%), Na-Dieca (0,45 %), H₂O q.s.p. 2 litros; pH 9,6 com H₂CO₃

PBS-T: NaCl (32,0g), KH₂PO₄ (0,8g), Na₂PO₄ (4,6g), KCl (0,8g), NaN₃ (0,02%), Tween 20 (0,05%), H₂O q.s.p. 4 litros; pH 7,4 com HCl

Tampão PEP (diluição do AS e do conjugado): PBS-T (1.200 ml), PVP (2%), ovalbumina (0,2%)

Tampão do substrato: dietanolamina (97 ml), NaN₃ (0,2 g), H₂O (800 ml)

Almofariz e pilão

Gaze

Micropipetas

Procedimento

a) preparo e adição das amostras: 8:00 hs.

As amostras serão maceradas em almofariz, na presença de tampão de extração. Colete aproximadamente 0,5 g de folhas e adicione 2,5 ml de tampão (diluição 1:5). Em seguida, adicione 100 µl de cada amostra nas respectivas cavidades da placa, conforme o esquema. Serão realizadas três repetições para cada amostra, ou seja, cada amostra será adicionada a quatro cavidades da placa. A incubação será a 37°C por aproximadamente uma hora.

b) lavagem da placa: 10:00 hs.

Após decorrido o período de incubação as placas são lavadas com PBS-T. As lavagens serão realizadas manualmente, com auxílio de uma pisseta. Inicialmente, remova os extratos vegetais virando a placa de para baixo, e em seguida adicione o PBS-T em cada cavidade. Deixe a placa em repouso por dois minutos, e repita a lavagem duas vezes.

c) preparo e adição do anti-soro: 10:30 hs.

Os anti-soros serão utilizados na diluição 1:10.000. Para tanto, adicione 1 µl de AS em uma placa de Petri, e em seguida adicione 10 ml do tampão PEP. Adicione 100 µl do AS diluído a cada cavidade da placa. A incubação será a 37°C por aproximadamente uma hora. Após a incubação, repita as lavagens (item b).

d) preparo e adição do conjugado: 12:00 hs.

O conjugado (cabra anti-coelho com fosfatase alcalina) será utilizado na diluição 1:2000, em PEP. Prepare um total de 10 ml de conjugado diluído, e adicione 100 µl em cada cavidade da placa. A incubação será a 37°C por aproximadamente 3 horas, repetindo-se as lavagens (item b) após a incubação.

e) preparo e adição do substrato: 15:30 hs.

O substrato utilizado será o *p*-nitrofenil-fosfato. Esse substrato está disponível na forma de pastilhas contendo 5 ou 20 mg. Prepare uma solução de substrato a 1 mg/ml em tampão do substrato. Mantenha as pastilhas sempre no escuro até que a dissolução destas no substrato se complete. Em seguida, adicione 100 µl de substrato em cada cavidade. As placas serão incubadas a temperatura ambiente, no escuro, até que os controles positivos desenvolvam a cor amarela (O.D. \approx 1,0). Esse tempo normalmente varia de 15 minutos a 1 hora. Os resultados serão obtidos após leitura da intensidade da cor em cada cavidade, em um aparelho apropriado.

f) interpretação dos resultados

A maneira mais simples e prática de se interpretar os resultados de um teste de ELISA é por meio de um gráfico de barras. Obtenha os valores médios de leitura para cada amostra (quatro cavidades), e construa um gráfico com as amostras no eixo *x*, e os valores de absorvância no eixo *y*. As amostras positivas são aquelas cujos valores de absorvância são superiores ao dobro do valor dos controles negativos. É comum que se use também o valor da média do controle negativo mais duas vezes o desvio padrão.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

A coluna 1 deve ficar em branco (calibração da leitora de placas)

2 A,B,C,D: _____

2 E,F,G,H: _____

3 A,B,C,D: _____

3 E,F,G,H: _____

4 A,B,C,D: _____

4 E,F,G,H: _____

5 A,B,C,D: _____

5 E,F,G,H: _____

6 A,B,C,D: _____

6 E,F,G,H: _____

7 A,B,C,D: _____

7 E,F,G,H: _____

8 A,B,C,D: _____

8 E,F,G,H: _____



FIP 320 - DIAGNOSE E CONTROLE DE DOENÇAS DE PLANTAS
EXTRAÇÃO DE DNA PARA DETECÇÃO DE GEMINIVÍRUS

1. Coletar um pequeno pedaço de tecido foliar e colocar em tubo de microcentrífuga de 1,5 ml.
2. Adicionar 500 μ l de tampão de extração e macerar com um pistilo plástico.
Opcionalmente, pode-se fazer a maceração em saco plástico, com o auxílio de um bastão de madeira ou de vidro ou de um pistilo de almofariz, transferindo-se então o macerado para o tubo.
3. Adicionar 33 μ l de SDS 20%, agitar por dois minutos e incubar a 65°C por dez minutos.
4. Adicionar 160 μ l de acetato de potássio 5M, agitar por dois minutos e centrifugar por dez minutos.
5. Remover o sobrenadante transferindo-o para um novo tubo.
6. Adicionar 0,5 volume de isopropanol, agitar e centrifugar por dez minutos.
7. Remover cuidadosamente o sobrenadante e descartá-lo.
8. Adicionar 500 μ l de etanol 70%, centrifugar por cinco minutos e remover todo o sobrenadante.
9. Secar a vácuo por cinco minutos e ressuspender em 150 μ l de água.

Tampão de extração: 100 mM TRIS pH 8.0
50 mM EDTA
500 mM NaCl
10 mM β -mercaptoetanol



UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE FITOPATOLOGIA



FIP 320 - DIAGNOSE DE DOENÇAS DE PLANTAS

REAÇÃO EM CADEIA DE POLIMERASE (PCR)

O exemplo abaixo consiste em uma reação de PCR para amplificação de fragmentos do DNA-A de vírus pertencentes ao gênero *Begomovirus* (um dos quatro gêneros da família *Geminiviridae*), utilizando oligonucleotídeos universais para esse gênero de vírus de plantas. Ao se preparar um grande número de reações para diagnose do mesmo tipo de vírus, como todas as reações são iguais (exceto o DNA molde e a enzima), é preparada uma mistura contendo todos os demais componentes da reação. O preparo dessa mistura minimiza os erros de pipetagem, comuns quando se trabalha com volumes da ordem de microlitros.

Composição da reação:

Componente	Volume por reação	Número de reações	Volume na mistura
tampão da enzima	5 µl		
MgCl ₂	5 µl		
dNTP's	4 µl		
oligonucl. 5' (1978)	0,5 µl		
oligonucl. 3' (496)	0,5 µl		
DNA molde	3 µl	-----	-----
Taq DNA polimerase	0,5 µl		
água	31,5 µl		
TOTAL	50 µl	-----	-----

Como DNA molde é utilizado DNA extraído das plantas a serem testadas. A seqüência dos oligonucleotídeos universais para o DNA-A de begomovírus (PAL1v1978 e PAR1c4960) foi determinada por Rojas *et al.* (Plant Disease 77:340, 1993).

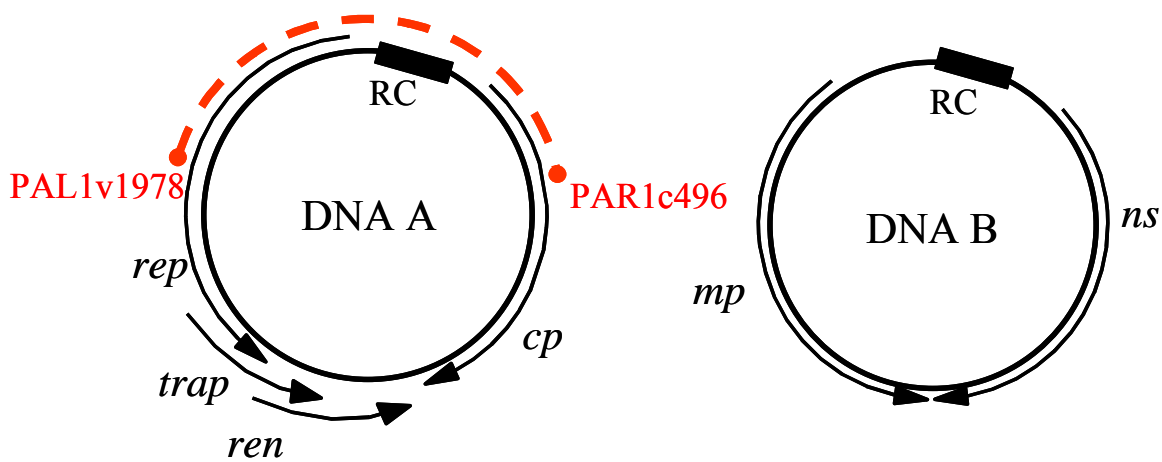
Os componentes da reação são adicionados ao tubo onde será preparada a mistura, na seguinte ordem:

água ⇒ tampão da enzima ⇒ MgCl₂ ⇒ dNTP's ⇒ oligonucleotídeos

Os tubos correspondentes a cada reação individual são mantidos no gelo enquanto se adiciona o DNA molde a cada tubo. A enzima é adicionada à mistura imediatamente antes de adicionar a mistura aos tubos individuais. Concluído o preparo da reação, os tubos são transferidos para o bloco do termociclador. O aparelho é programado com os seguintes parâmetros:

- . 94°C por 1 minuto (desnaturação)
- . 50°C por 1 minuto (alinhamento)
- . 72°C por 2 minutos (extensão)
- . 35 ciclos
- . extensão final a 72°C por 10 minutos
- . incubação final a 4°C

Concluída a reação, os resultados são analisados por meio de eletroforese em gel de agarose (0,9%) em tampão TBE, corado com brometo de etídeo. O fragmento amplificado, nesse caso, deve ter aproximadamente 1.200 pares de bases.



Representação esquemática do genoma de um begomovírus típico. O genoma viral é composto por duas moléculas de DNA de fita simples, circulares. Ambos os componentes genômicos (DNA-A e DNA-B) possuem aproximadamente 2.600 nucleotídeos, e suas seqüências de nucleotídeos são completamente diferentes, exceto por uma região comum (RC) com aproximadamente 200 nucleotídeos que contém a origem de replicação. Os genes presentes em cada componente estão indicados pelas setas. Em tracejado está representada a região amplificada pelos oligonucleotídeos universais PAL1v1978 e PALc496.