



XL CONGRESSO PAULISTA DE FITOPATOLOGIA
Instituto Agrônomo - Campinas, SP
7 a 9 de Fevereiro de 2017

**MESA REDONDA 7: DIAGNOSE E MONITORAMENTO DE
FITOPATÓGENOS NO AGRONEGÓCIO**

Nesta mesa redonda será evidenciada a importância da diagnose, na tomada de decisão, no momento de controle preventivo, para uma defesa vegetal sustentável e de relação custo-benefício favorável.

Serão apresentadas técnicas modernas para a realização de diagnósticos, com a correta acurácia, bem como de biomonitoramento da expressão de sintomas.

Como resultado desta discussão, espera-se alertar para a necessidade de inclusão de técnicas de diagnose de patógenos no campo.

Moderador: José A. Caram de S. Dias (IAC/APTA/SAA)

Palestra 1: LAMP: Ferramenta molecular rápida e precisa no diagnóstico fitossanitário

Valmir Duarte

Agrônoma - Laboratório de Diagnóstico Fitossanitário e Consultoria, Avenida Ipiranga, 7464, Conj. 1202, Jardim Botânico, 91530-000 Porto Alegre, RS.
valmir@agronomicabr.com.br

A diagnose rápida de uma doença ou a detecção de um patógeno específico são demandas correntes no dia-a-dia de um laboratório de clínica vegetal ou de profissionais da agricultura. Obviamente, não tem método mais rápido do que o conhecimento da assinatura da doença, quando for clínica vegetal, baseando-se nos sintomas e sinais. Como exemplo, as lesões de cancro cítrico causadas pela bactéria *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* em folhas de laranjeira têm características únicas que são distintas de outras doenças e o profissional não terá dúvidas. No entanto, particularmente na fiscalização, mas também como teste confirmatório na tomada de decisões de manejo, um segundo método é recomendado.

O uso de tiras imunológicas com antissoro específico não tem concorrente no quesito velocidade, pois o resultado é obtido em poucos minutos. O fato é que não existe tira imunológica disponível para a maioria dos patógenos. Neste caso, a reação em cadeia da polimerase (PCR) tem sido o método mais amplamente utilizado, tanto a



XL CONGRESSO PAULISTA DE FITOPATOLOGIA Instituto Agrônomo - Campinas, SP

7 a 9 de Fevereiro de 2017

convencional como em tempo real, bastando adquirir as sondas e primers específicos, conforme a demanda. O problema é que o custo do termociclador e de todo o aparato necessário criam limitações na sua aplicação, particularmente em laboratórios com menos recursos ou no campo. Independente desses fatores, muitas das PCRs têm duração de no mínimo duas horas e meia.

Visando agregar novidades no diagnóstico fitossanitário, considerando que o ponto crucial é a rapidez, abordaremos duas técnicas, uma facilita o envio da amostra, servindo para purificar o ácido nucleico e garantir sua integridade, e a segunda o seu processamento.

A velocidade do diagnóstico por PCR ou outra técnica de amplificação do DNA passa por um método rápido e fácil de preparação do ácido nucleico. A tecnologia Whatman™ FTA™ Card (WHATMAN, 2017) é um procedimento que atende estes requisitos. Pode ser utilizado na coleta de amostras no campo ou no laboratório. O tecido vegetal com suspeita de conter a praga (bactéria, fungo, vírus, nematoide...) é fisicamente esmagado no cartão FTA, que contém reagentes químicos que protegem o DNA da degradação e permitem que seja armazenado à temperatura ambiente por longos períodos de tempo. Para preparar a amostra para PCR, por exemplo, um disco (1,2-2 mm de diâmetro) é lavado com dois tampões aquosos não tóxicos. O disco, com o DNA, é utilizado na reação ou o DNA eluído. Portanto, o cartão FTA reduz os passos de obtenção do DNA, transporte, purificação e estocagem e, conseqüentemente, o custo e tempo requerido para o diagnóstico fitossanitário. Se o alvo for RNA, o tampão de purificação é alterado.

Com o DNA eluído, a novidade é utilizar a técnica do LAMP (*Loop-mediate isothermal amplification* ou Amplificação isotérmica mediada por laço), processo de amplificação de ácido nucleico à temperatura constante (isotérmica, 60-67 °C), que gera rapidamente (± 25 min) uma grande quantidade de DNA (500 ng/ μ L) (NOTOMI et al. 2000; CARDOZA & DUARTE, 2015). O LAMP é uma técnica simples, rápida e de baixo custo, com alta sensibilidade, com possibilidade de aplicação nas diversas situações do diagnóstico fitossanitário, contemplando a fiscalização e levantamentos de campo.

Concluindo, nossa tese é que o cartão FTA e o LAMP são duas tecnologias complementares com grande utilidade no diagnóstico fitossanitário nas condições de Brasil e que ainda são ignoradas pelos potenciais usuários.



XL CONGRESSO PAULISTA DE FITOPATOLOGIA
Instituto Agrônomo - Campinas, SP

7 a 9 de Fevereiro de 2017
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CARDOZA, Y.F.; DUARTE, V. Amplificação isotérmica mediada por alça (LAMP) e sua aplicação na detecção de pragas da batata. **Batata Show**, Itapetininga, SP, p. 16 - 19, 01 dez. 2015.

NOTOMI, T.; OKAYAMA, H.; MASUBUCHI, H.; YONEKAWA, T.; WATANABE, H.; AMINO, N.; HASE, T. Loop-Mediated Isothermal Amplification of DNA. **Nucleic Acids Research** 28 (12): E63.2000.

WHATMAN™ FTA™ Card. Disponível em:

<http://www.gelifesciences.com/webapp/wcs/stores/servlet/catalog/en/GELifeSciences/brands/whatman/>. Acesso em: 04 jan.2017.

Palestra 2. Técnicas de diagnose utilizadas para prospecção de ‘Candidatus Liberibacter’ solanacearum em olerícolas no Brasil

Gabriela R. Teresani

Gabriela R. Teresani¹, Taciana M. de A. Kuhn², Edson Bertolini³, Natalino Shimoyama⁴, João R. S. Lopes², José Alberto Caram de Souza Dias¹
¹APTA/IAC – CPDFitossanidade, Campinas, SP, Brasil. ²Departamento de Entomologia e Acararologia, ESALQ/USP, Piracicaba, SP, Brasil. ³Departamento de Fitossanidade. Faculdade de Agronomia. Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brazil. ⁴Associação Brasileira da Batata (ABBA), Itapetininga, SP, Brasil. gabiteresani@gmail.com

‘*Candidatus Liberibacter*’ é um gênero bacteriano que pertence ao grupo α -Proteobacteria. As espécies encontradas nesse gênero são transmitidas por psílídeos vetores e estão associadas a sérias doenças de plantas, causando grandes perdas econômicas aos cultivos e suas respectivas indústrias. Atualmente existem 5 espécies de ‘*Ca. Liberibacter*’ reconhecidas, das quais 4 são fitopatogênicas, entre as quais, 3 estão associadas com o HLB (huanglongbing) dos citros: ‘*Ca. L. africanus*’, ‘*Ca. L. asiaticus*’ e ‘*Ca. L. americanus*’. HLB é a doença mais grave que afeta a indústria citrícola na África, Ásia e nas Américas (Estados Unidos e Brasil) na atualidade. Por esse motivo, a citricultura brasileira se vê severamente afetada. A quarta espécie de *Liberibacter* fitopatogênica, ‘*Ca. L. solanacearum*’, está associada com a doença zebra chip em batatas, psyllid yellows em tomate e pimentão nos Estados Unidos e Nova Zelândia,



XL CONGRESSO PAULISTA DE FITOPATOLOGIA **Instituto Agrônomo - Campinas, SP**

7 a 9 de Fevereiro de 2017

yellows decline em cenouras em vários países da Europa e África (HAAPALAINEN, 2014) e com desordens vegetativas em aipo na Espanha (TERESANI et al., 2014).

‘*Ca. L. solanacearum*’ é uma bactéria Gram-negativa, não cultivável *in vitro*, restrita ao floema das plantas e ao corpo de psilídeos que atuam como vetores. É transmitida de maneira persistente, circulativa e transovariana por diferentes espécies de psilídeos, podendo também ser disseminada através de material de propagação (tubérculos de batata infectados e sementes verdadeiras de cenoura).

Protocolos de reação em cadeia da polimerase (PCR), tanto convencional como a tempo real, foram desenvolvidos para detectar ou identificar ‘*Ca. L. solanacearum*’. Na maioria dos modelos bacterianos, PCR a tempo real tem vantagens sobre PCR convencional por ser mais sensível e mais confiável.

Desde 2015 estão sendo realizadas prospecções da bactéria ‘*Ca. L. solanacearum*’ em diferentes regiões produtoras de olerícolas no país, e para que esse trabalho seja desenvolvido, um protocolo de PCR a tempo real que utiliza sonda TaqMan para detecção específica da bactéria (TERESANI et al., 2014) está sendo utilizado. Esta tecnologia foi validada em um estudo intra-laboratório e se mostrou muito sensível, específica e precisa. Este protocolo é capaz de detectar a bactéria tanto em material vegetal como em psilídeos.

As informações geradas representam um passo a frente para a fitopatologia brasileira, uma vez que o problema vem sendo tratado de forma preventiva. Os resultados dessas pesquisas fornecerão informações epidemiológicas importantes que servirão para evitar: (1) a introdução, caso a bactéria não seja detectada (sustentando procedimentos normatizações do MAPA quanto às medidas de barreiras fitossanitárias, situando o patógeno como "praga quarentenária", ou (2) a disseminação caso a bactéria seja detectada no país, e auxiliarão na adoção de medidas de manejo e controle.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

HAAPALAINEN, M. Biology and epidemics of *Candidatus* Liberibacter species, psyllid-transmitted plant-pathogenic bacteria. **Annals of Applied Biology**, doi: 10.1111/aab.12149. 2014.

TERESANI, G.R.; BERTOLINI, E.; ALFARO-FERNÁNDEZ, A.; MARTÍNEZ, C.; TANAKA, F.A.O.; KITAJIMA, E.W.; ROSELLÓ, M.; SANJUÁN, S.; FERRÁNDIZ,



XL CONGRESSO PAULISTA DE FITOPATOLOGIA Instituto Agrônômico - Campinas, SP

7 a 9 de Fevereiro de 2017

J.C.; LÓPEZ, M.M.; CAMBRA, M.; FONT, M.I. Association of 'Candidatus Liberibacter solanacearum' with a vegetative disorder of celery in Spain and development of a real-time PCR method for its detection. **Phytopathology**, v.104, p. 804-811. 2014.

Palestra 3: Contribuições da Bio-Imuno Diagnose no Monitoramento de Virose em Solanaceas: potencial auxiliar nas inspeções fitossanitárias/certificação de sementes e mudas

José Alberto Caram de Souza-Dias

SOUZA-DIAS, J.A.C. de¹, SAWASAKI, H.E.², MENARIN, E.³, RENTZ, R.³, FERNANDES, C. R. F.⁴, ARIKITA, H.⁵, PULCINELLI, C.E.⁶, DELFRATE, A.⁶, LUDERS, G.⁶, D'ANDREA, P. A.⁷. ^{1,2}APTA/Instituto Agrônômico (IAC), 13020-902 Campinas, SP. ¹CPD-Fitossanidade, ²CPD- Recursos Genéticos. ³Coop. Castrolanda, Castro, PR. ⁴G. Trevisan, Sacramento-MG, ⁵G. Ioshida, Taquarituba, SP. ⁶British American Tobacco/Breeding Centre, Rio Negro, PR. ⁷Microbiol-Microgeo, Limeira, SP. ¹CNPq/PDTEI/FUNDAG. jcaram@iac.sp.gov.br

Introdução: A produção e certificação de material de propagação, principalmente das espécies de solanáceas cultivadas, destacando-se entre estas o tomateiro (*Solanum lycopersicum*), a batateira (*Solanum tuberosum*) e o fumo (*Nicotiana tabacum*), demandam periódicas visitas de inspetores-certificados, capacitado para reconhecer anomalias abióticas ou bióticas, particularmente as perpetuáveis via material de propagação. Nesse mister, a dificuldade no reconhecimento de viroses se destacam.

O **bio-imunomonitoramento** tem se mostrado uma ferramenta auxiliadora, de fácil acesso aos trabalhos de inspetores-certificadores, racionalizando e objetivando o serviço das clínicas fitopatológicas (Souza-Dias et al., 2012) . A observação visual periódica das plantas indicadoras expostas (sentinelas) e testes preliminares de imuno-diagnose, em campo, racionalizam o envio de material vegetal para laboratório (geralmente distantes). É uma ferramenta auxiliar na identificação de anomalias sugestivas de viroses.

Em regiões do sul, as culturas de batata e fumo são próximas, geralmente. Ambas são suscetíveis a várias viroses em comum, transmitidas por afídeos; com ameaças também de mosca branca. O bio-imunomonitoramento de fitovirose, particularmente nas plantações de batata, nas regiões sul, sudeste e centro este do Brasil,



XL CONGRESSO PAULISTA DE FITOPATOLOGIA Instituto Agrônomo - Campinas, SP

7 a 9 de Fevereiro de 2017

têm sido satisfatórios; particularmente à virose do mosaico, causada pelo vírus: *Potato virus Y* (PVY), uma das mais danosas e comuns a ambas as culturas, com mutações e recombinações entre as estirpes dos grupos PVY^O e/ou PVY^N (Sawasaki, et al., 2009).

Sintomas da infecção primária de estirpes do grupo PVY^N, em plantas de batata ou fumo, podem passar despercebida, ou confundida com outros fatores (a) bióticos. Nos últimos seis anos, o bio-imunomonitoramento vem revelando ser acessível e eficaz na: 1- detecção precoce do PVY vindo de fora-para-dentro (1-2 semanas) e 2- tomada de decisões quanto ao manejo integrado no controle da virose, em campos de produção de batata-semente e mudas de fumo.

Metodologia: no **bio-monitoramento**, plantas de *Datura metel* (*Dm*) e *D. stramonium* (*Ds*), produzidas livres de vírus em telados, são indicadoras ou discriminadoras do PVY respectivamente. Quatro a seis grupos de 5 a 10 plantas de *Ds* e *Dm*, são transplantadas-intercaladas (estádio de 4 a 5 folhas), junto com o plantio de batata e fumo: *Dm* é suscetível, mostrando em 10-15 dias clareamento e ondulação das nervuras nos folíolos apicais (Kahn & Monroe, 1970) e *Ds* é imune ao PVY. Durante todo o ciclo da cultura, a cada 7-15 dias é feita as inspeções; frutos são retirados (evitando sementes e promovendo novas folhas apicais).

No **imuno-monitoramento** é utilizado kits de 10 microtubos (mtb): 8 para uso/amostra e 2 controles (+ e -). Os mtbs têm tampa e vol. 200 uL (usado no PCR de imuno-captura); são inseridos em isopor (5 x 2 x 3 cm) e cobertos (50 uL) com antissoro (IgG)/PVY (SASA/UK ou DSMZ/DE). Para envio ao produtor via correio ("SEDEX"), cada mtb recebe 50 uL de tampão de. Ao receberem os *kits* (2 a 3 dias úteis), o produtor, no campo, coleta extrato (suco) foliar (2 a 3 gotas = 20 a 30 uL) de cada planta/amostra em um mtb, via maceramento (fricção com dedos das mãos) em saco plástico fornecido com o kit. Concluída a extração das amostras de Nos 1 a 8, deixando mtbs 9 e 10 para uso no laboratório (controles), os *kits* retornam via SEDEX para o laboratório que os enviou, o qual concluirá os testes, como usual no DAS-ELISA-microplacas.

Resultados e Discussão: no **bio-monitoramento**, ausência de sintomas em *Ds*, mas não em *Dm* indicam a presença de PVY e portanto, introdução e risco de disseminação na plantação ao redor. De forma similar, *Ds* com sintomas, podem indicar introdução-disseminação de outros vírus: (A) PLRV ou ToCV; (B) *Begomoviruses* (ToSRV, ToYVSV), (C) TSWV e (D) TSV (streak do fumo), manifestando: (A) amarelo internerval e rigidez das folhas medianas; (B) mosaico amarelo deformante; (C)



XL CONGRESSO PAULISTA DE FITOPATOLOGIA Instituto Agrônomo - Campinas, SP

7 a 9 de Fevereiro de 2017

pontos necróticos dourados e severa necrose das nervuras, avançando para manchas necróticas tipo losângulo nas hastes, seca e morte do ponteiro; e (D) folhas apicais com margens denteadas e porte reduzido (JEFFRIES, 1998).

A presença desses vírus foi confirmada por testes bio-imuno-molecular. Na fumicultura, sintomas em *Ds*, mas não nas *Dm* permitiram identificação precoce do vírus *streak* (*Tomato streak virus* - TSV). Em contraste, a não visualização (manifestação) de sintomas em *Dm* e *Ds* indicaram a não introdução desses vírus, via insetos vetores.

No **Imuno-monitoramento**: os resultados dos *kits* são fornecidos por e-mail dentro de um a dois dias após retorno dos *kits* ao laboratório. Em três campos de fumo e sete de batata, o PVY foi detectado por ELISA-mtb em 75 a 100% das amostras, sendo posteriormente confirmado o PVY^N (via inoculação mecânica em plantas de *N. tabacum* cv. Burley 21), ou quando plantas progênie, tiveram folhas testadas por ELISA ou PCR.

Conclusão: Bio-monitoramento tem sido uma forma eficiente, prática e acessível a pequenos produtores, para monitorar e tomar decisões quanto à disseminação ou não, de viroses em campos de produção de mudas e de certificação de batata-semente e fumo.

O imuno-monitoramento via *kits* de mtb tem apresentado resultados confiáveis (conferido com os controles dos produtores). A aplicação desse sistema inovador de monitoramento de viroses, permite alertar precocemente: (1) entrada de vírus, de-fora-para-dentro de plantações de batata ou fumo, em pequenas ou grandes áreas; (2) ações de controle (erradicação, isolamento ou químico/inseticida); e (3) testar imunologicamente tecido vegetal fresco, sem perda da turgidez por dispensar transporte (*just in time*), recebendo e mantendo os resultados em conexão com especialista-virologista.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

JEFFRIES, C.J. Potato: safe movement of germplasms. **Bulletin** 19. FAO/IPGRI. 177p. 1998.

KAHN, R.I.; MONROE, R. *Datura metel* L. as a virus-indicator plant. **Phytopathology** 60: 1183-5. 1970.



XL CONGRESSO PAULISTA DE FITOPATOLOGIA
Instituto Agronômico - Campinas, SP

7 a 9 de Fevereiro de 2017

LACROIX, C.L. GLAISC, J.L.; VERRIERB, C.; CHARLIERD, C.; LORENCETTIE, E.; JACQUOTA. Impact of tobacco recessive resistance gene *va* on biological properties of Brazilian Potato virus Y (PVY) isolates. **Plant Pathology** 60: 1048-1054. 2011.

SAWAZAKI, H.E.; SOUZA-DIAS, J.A.C.; LORENZEN, J.H.; JEFFRIES, C. *Potato Virus Y^{NTN}*: A coat and P1 protein sequences analysis of a brazilian isolate. **Potato Res.** 52(4): 379-392. 2009.

SOUZA-DIAS, J.A.C. de; TIBO, L.H.S; RAMOS, V.J.; CHARKOWSKI, A. Bio-monitoring Insect transmitted viruses in solanaceous crops via symptoms in *Datura stramonium* and *D. metel*: an update. cd rom - **Tropical Plant Pathology** 37 (suplem). 2012.