



ESALQ

Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz
Universidade de São Paulo

LFT5870 AGENTES CAUSAIS DE DOENÇAS DE PLANTAS: VÍRUS

Prof. Jorge Alberto Marques Rezende

Piracicaba, SP, Brasil



ESALQ

Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz
Universidade de São Paulo



Laboratório de
Virologia Vegetal
Esalq | USP

PARTE VII

DIAGNÓSTICO DE FITOVIROSES



1. RECONHECIMENTO

2. FATORES QUE INDUZEM SINTOMAS SEMELHANTES AOS DAS VIROSES

3. DIAGNOSE

1. Sintomas da planta no campo

- Experiência do investigador
- Infecção mista
- Estirpes diferentes
- Vírus que causam sintomas semelhantes
- Efeito do ambiente



ESALQ

Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz
Universidade de São Paulo

ESTIRPES DIFERENTES



Laboratório de
Virologia Vegetal
Esalq | USP



Vírus do mosaico comum da abobrinha



ESALQ

Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz
Universidade de São Paulo



Laboratório de
Virologia Vegetal
Esalq | USP

VÍRUS QUE CAUSAM SINTOMAS SEMELHANTES



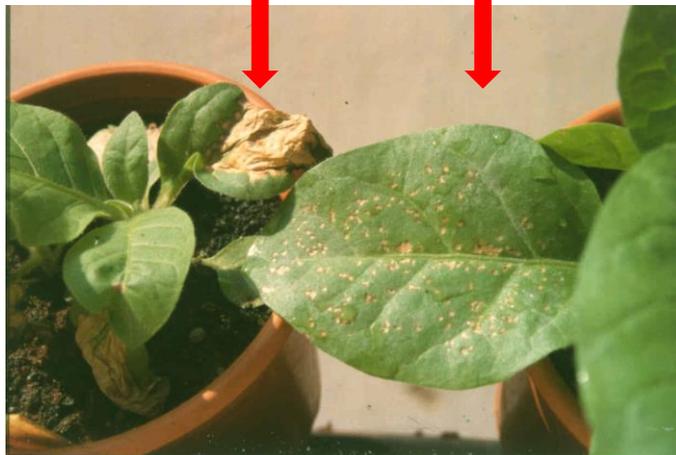


2. Planta indicadora

Espécie que reage com sintomas característicos e consistentes para o(s) vírus em estudo.

EX: International Society for Horticultural Science tem uma lista internacional de indicadoras para identificação de viroses e similares em 8 espécies de frutíferas lenhosas (Duniz, 1983).

Vírus do mosaico
do fumo



Vírus do mosqueado
do pimentão



Vírus do mosaico amarelo
da abobrinha





Table 1

Virus diseases of grapevine, their geographical distribution, diagnostic and therapeutic methods
Viruskrankheiten der Rebe, ihre geographische Verbreitung sowie Diagnose- und Therapiemethoden

Disease	Geographical distribution	Mechanical transmissibility of agents	Diagnostic methods ¹⁾	Woody indicators	Duration of heat treatment (d)
1. Infectious degeneration complex					
a. Fanleaf and related diseases	Worldwide	Yes	S, HI, WI	<i>V. rupestris</i>	30—35
b. Diseases induced by other European NEPO viruses	Europe	Yes	S, HI, WI	<i>V. rupestris</i>	30—35
2. Grape decline (American NEPO viruses)	U.S.A., Canada	Yes	S, HI, WI	Several French hybrids and <i>V. vinifera</i> cvs.	50 (TomRSV)
3. Enations	Probably worldwide	Uncertain	WI	Italia, Kober 5 BB	Unknown
4. Legno riccio (stem pitting, stem grooving)	Worldwide	Uncertain	WI	420 A, Kober 5 BB, <i>V. rupestris</i>	Unknown
5. Leafroll	Worldwide	Uncertain	WI	LN-33, Baco 22 A, Pinot noir Cabernet franc, Mission, Prokupack	60—120
6. Corky bark	Probably worldwide	No	WI	LN-33	More than 90
7. Fleck	Probably worldwide	No	WI	<i>V. rupestris</i>	80—120
8. Vein mosaic	Several European countries Australia (?)	No	WI	<i>V. riparia</i> Gloire de Montpellier	Unknown
9. Vein necrosis	Several European countries	No	WI	110 R.	Unknown
10. Yellow speckle	Probably worldwide	No	WI	Mission seedling 1, Esparte Rcatziteli (?)	Heat resistant
11. Asteroid mosaic	U.S.A. (California)	No	WI	<i>V. rupestris</i>	40—45

¹⁾ S = Serology; HI = Herbaceous indicators; WI = Woody indicators.

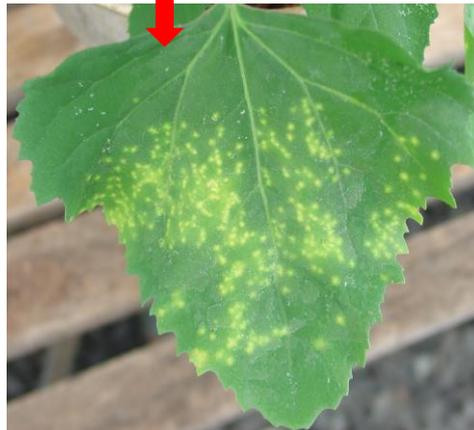


3. Hospedeiras diferenciais

Vírus	Indicadoras			
	Abóbora	<i>C. quinoa</i>	<i>C. amaranticolor</i>	Feijão BT-2
PRSV-W	Mosaico	-	-	-
ZYMV	Mosaico	L.L.C	L.L.N.	-
WMV	Mosaico	L.L.C	L.L.N.	Mosaico



Abobrinha de moita



Chenopodium quinoa



Chenopodium amaranticolor



ESALQ

Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz
Universidade de São Paulo



Laboratório de
Virologia Vegetal
Esalq | USP

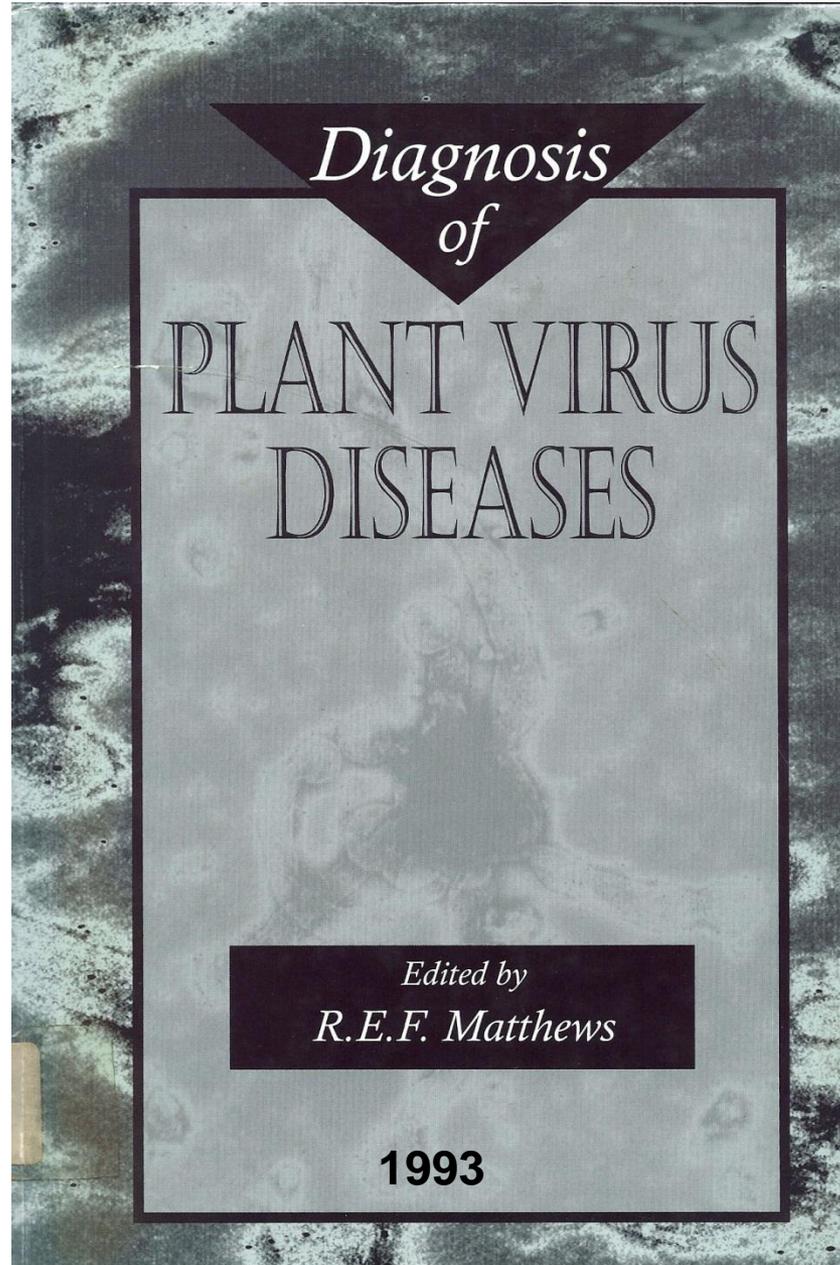




Table 1. Suggested Species for Identification of Virus Groups

Group	Host plants	Nonhost plants
Alfalfa mosaic virus ^a	<i>Chenopodium amaranticolor</i> <i>C. quinoa</i> <i>Nicotiana benthamiana</i> <i>Phaseolus vulgaris</i> <i>Vigna unguiculata</i>	<i>Cucurbita pepo</i> <i>Paulownia fargesii</i>
<i>Bromovirus</i>	<i>Chenopodium amaranticolor</i> <i>C. hybridum</i> <i>Nicotiana clevelandii</i> <i>Pisum sativum</i> <i>Vigna unguiculata</i>	<i>Brassica oleracea</i> <i>Dianthus caryophyllus</i> cv. William Sim <i>Nicotiana tabacum</i> cv. Samsun <i>Phaseolus lunatus</i> cv. Henderson
<i>Carlavirus</i>	<i>Chenopodium quinoa</i> <i>Datura metel</i> <i>Humulus lupulus</i> <i>Lilium longiflorum</i> <i>Nicotiana clevelandii</i> <i>Pisum sativum</i>	<i>Cucumis sativus</i> <i>Datura stramonium</i> <i>Nicotiana glutinosa</i> <i>N. sylvestris</i> <i>Phaseolus vulgaris</i> cv. Red Kidney <i>Vigna unguiculata</i>
<i>Carmovirus</i>	<i>Brassica pekinensis</i> <i>Chenopodium quinoa</i> <i>Cucumis sativus</i> <i>Glycine max</i> <i>Hibiscus rosa-sinensis</i> <i>Narcissus</i> cv. Barnett Browning <i>Nicotiana clevelandii</i> <i>Phaseolus vulgaris</i> <i>Spinacia oleracea</i> <i>Tetragonia expansa</i> <i>Vigna unguiculata</i>	<i>Beta vulgaris</i> <i>Datura metel</i> <i>Lagenaria siceraria</i> <i>Nicotiana glutinosa</i> <i>N. tabacum</i> <i>Pelargonium domesticum</i> cv. Nittany Lion <i>Pisum sativum</i> <i>Tropaeolum majus</i> <i>Vicia faba</i> <i>Vigna sinensis</i> <i>Vigna sinensis</i> cv. Blackeye
<i>Caulimovirus</i>	<i>Brassica campestris</i> <i>Glycine max</i> <i>Phaseolus vulgaris</i> cv. Kintoki <i>Saponaria vaccaria</i> var. Pink Beauty <i>Vaccinium</i> spp. <i>Zinnia elegans</i>	<i>Chenopodium quinoa</i> <i>Cucumis sativus</i> <i>Datura stramonium</i> <i>Gomphrena globosa</i> <i>Nicotiana glutinosa</i> <i>Vigna sinensis</i>



Table 2. Suggested Species for Identification of Individual Viruses

Virus name^a	Acronym^b	Host plants	Nonhost plants
African cassava mosaic <i>Geminivirus</i> (II)	ACMV	<i>Datura stramonium</i> <i>Nicotiana benthamiana</i> <i>N. clevelandii</i>	<i>Chenopodium</i> <i>amaranticolor</i> <i>C. quinoa</i> <i>Gomphrena globosa</i> <i>Tetragonia expansa</i>
Agropyron mosaic <i>Potyvirus</i> (mite)	AgMV	<i>Agropyron repens</i> <i>Lolium multiflorum</i>	<i>Chenopodium</i> <i>amaranticolor</i> <i>C. quinoa</i> <i>Datura stramonium</i> <i>Nicotiana tabacum</i>
Alfalfa latent <i>Carlavirus</i>	ALV	<i>Cassia occidentalis</i> <i>Vicia faba</i>	<i>Chenopodium</i> <i>amaranticolor</i> <i>C. quinoa</i> <i>Cucumis sativus</i> <i>Datura stramonium</i> <i>Gomphrena globosa</i>
Alfalfa mosaic virus ^c	AMV	<i>Chenopodium quinoa</i> <i>Nicotiana benthamiana</i> <i>Nicotiana tabacum</i> <i>Phaseolus vulgaris</i>	<i>Cucurbita pepo</i> <i>Tetragonia crystallina</i>
American hop latent <i>Carlavirus</i>	AHLV	<i>Chenopodium quinoa</i> <i>Datura stramonium</i>	<i>Nicotiana clevelandii</i> <i>N. glutinosa</i> <i>N. tabacum</i> cv. White Burley
American plum line pattern <i>Ilarvirus</i>	APLPV	<i>Cucumis sativus</i> <i>Nicotiana megalosiphon</i> <i>N. occidentalis</i>	<i>Gomphrena globosa</i>
Andean potato mottle <i>Comovirus</i>	APMV	<i>Nicandra physaloides</i> <i>Nicotiana clevelandii</i>	<i>Chenopodium</i> <i>amaranticolor</i> <i>C. quinoa</i>
Apple chlorotic leaf spot ? <i>Closterovirus</i>	ACLSLV	<i>Chenopodium</i> <i>amaranticolor</i> <i>C. quinoa</i> <i>Phaseolus vulgaris</i> cv. Pinto	<i>Cucumis sativus</i> <i>Gomphrena globosa</i> <i>Nicotiana clevelandii</i> <i>N. tabacum</i> <i>Vigna sinensis</i>



4. Modo de transmissão

Mecânica, afídeos, tripes, nematóides, etc.

EX: Vírus de partículas isométricas.

- Transmitido por semente e por nematóide = NEPOVIRUS.
- Transmitido por besourinho = TYMOVIRUS,
COMOVIRUS, BROMOVIRUS OU SOBEMOVIRUS.
- Transmitido mecanicamente e por
Myzus persicae = VÁRIOS



5. Microscopia eletrônica de transmissão

A. “Leaf dip” ou contrastação negativa e cortes ultrafinos

B. Inclusões citoplasmáticas: Mic. de luz e MET.

Tipos: agregados de partículas; agregados de capas protéicas; agregados de proteínas não estruturais; alterações de constituintes celulares; combinações desses.

Localização: citoplasma; núcleo; citoplasma e núcleo; vacúolos e citoplasma

Corantes para microscopia de luz:

Azure A

Calcomine Orange-Luxol Brilliant Green

Edwardson and Christie, 1993

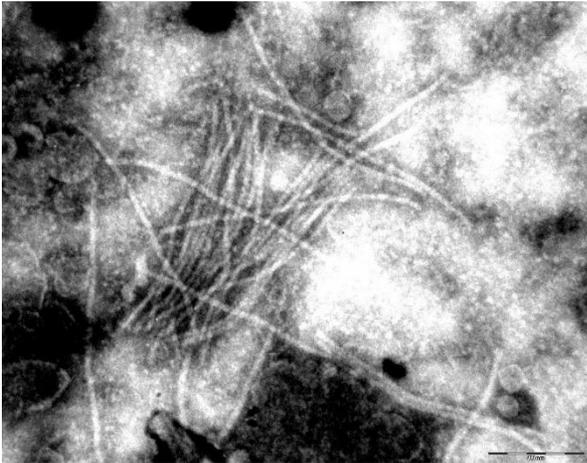


ESALQ

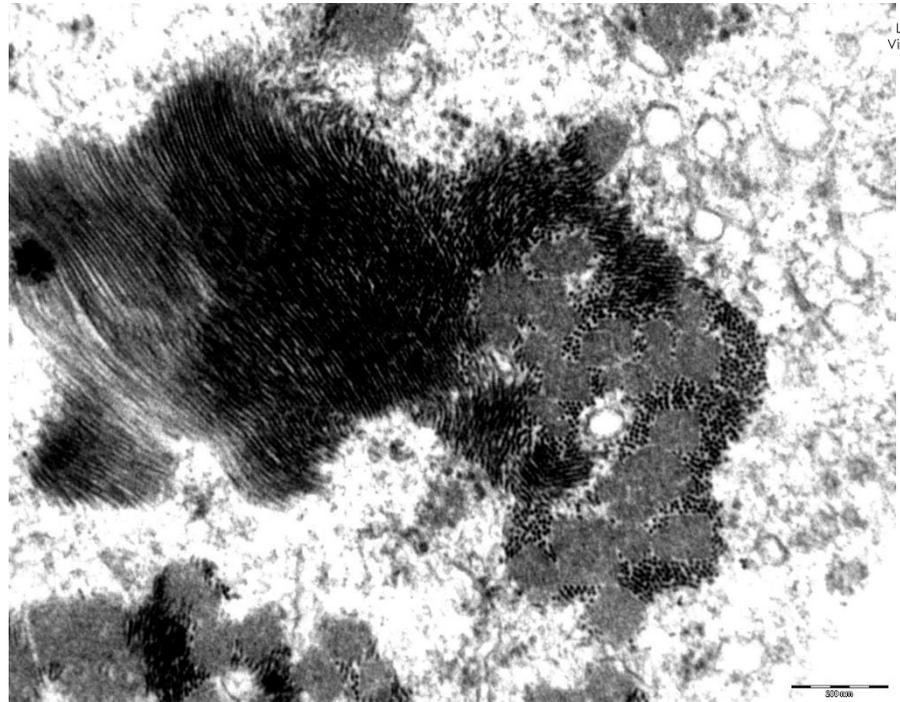
Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz
Universidade de São Paulo



Laboratório de
Virologia Vegetal
Esalq | USP



Leaf dip Potexvirus fedegoso



Corte ultra-fino Potexvirus fedegoso

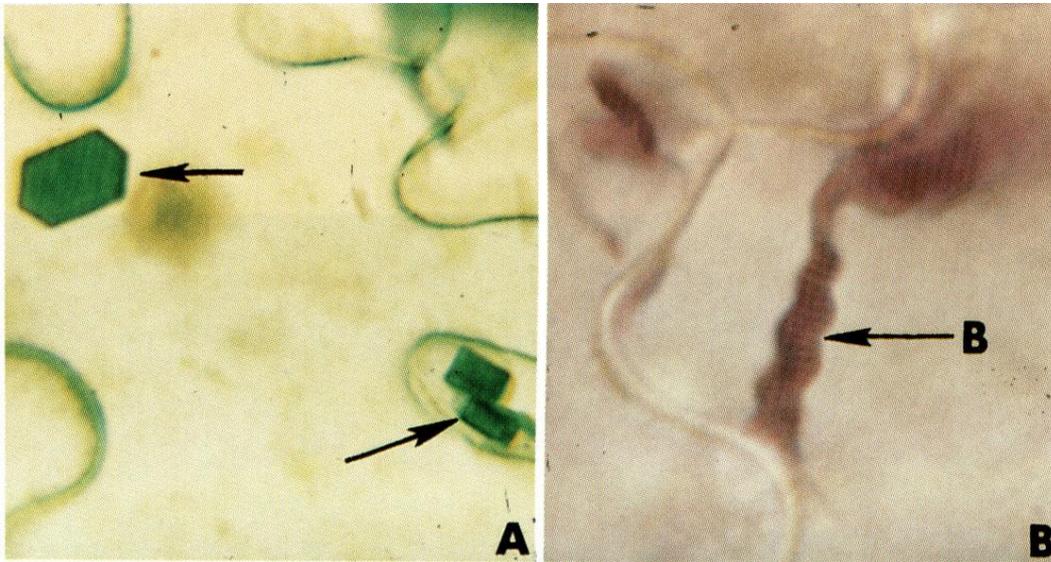


PLATE 1. (A) Crystalline inclusions of tobacco mosaic *Tobamovirus* particles in Turkish tobacco. (Magnification $\times 970$). (B) Banded-body inclusion (**B**) induced by papaya mosaic *Potexvirus* in *Nicotiana benthamiana*.

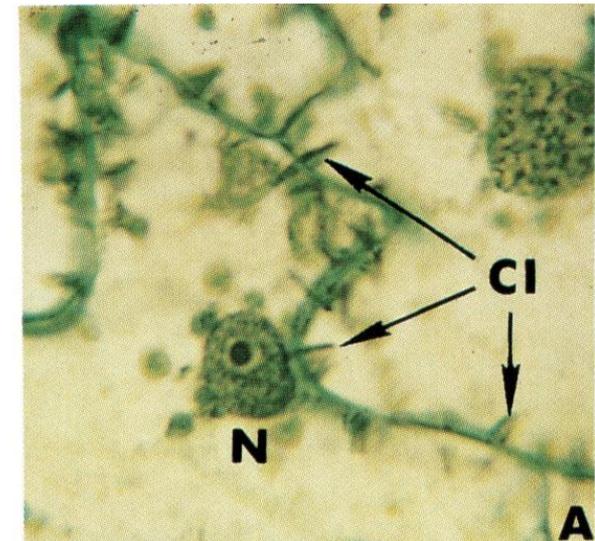
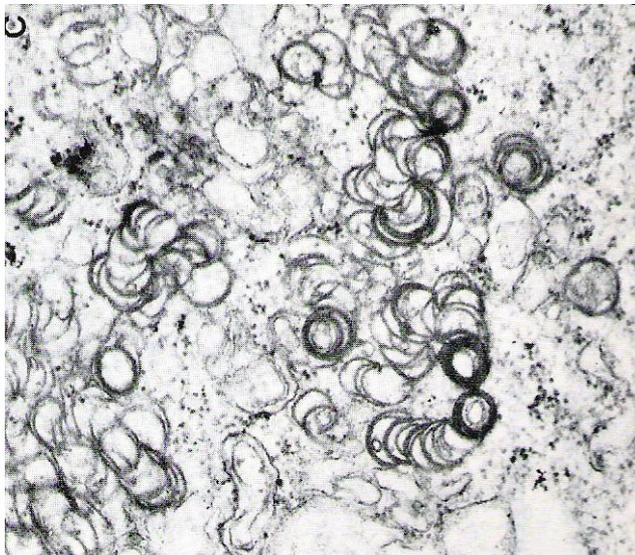


PLATE 6. Cylindrical inclusions induced by potyviruses. (A) Pepper mottle *Potyvirus*-induced cylindrical inclusions (**CI**) on cell walls, early infection, nucleus (**N**) in *Nicotiana tabacum* var. Turkish. (Magnification $\times 970$). (B) Pepper mottle *Potyvirus*-induced cylindrical inclusions



6. Sorologia

ELISA (**E**nzyme **L**inked **I**mmuno**S**orbent **A**ssay)

Vantagens: Sensível (1 ng/ml), rápido, econômico, baixo custo, seguro e teste de várias amostras.

Quantitativo

Muito útil para testes de rotina.

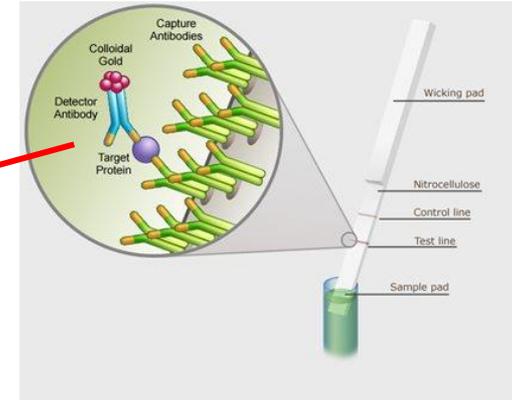
Desvantagens: Não mede infectividade e reação inespecífica.

Western blot, dot blot, tissue printing



SEROLOGIA: ELISA

Teste da fita



<https://www.foodchainid.com/>

Enzyme Linked Immunosorbent Assay - ELISA

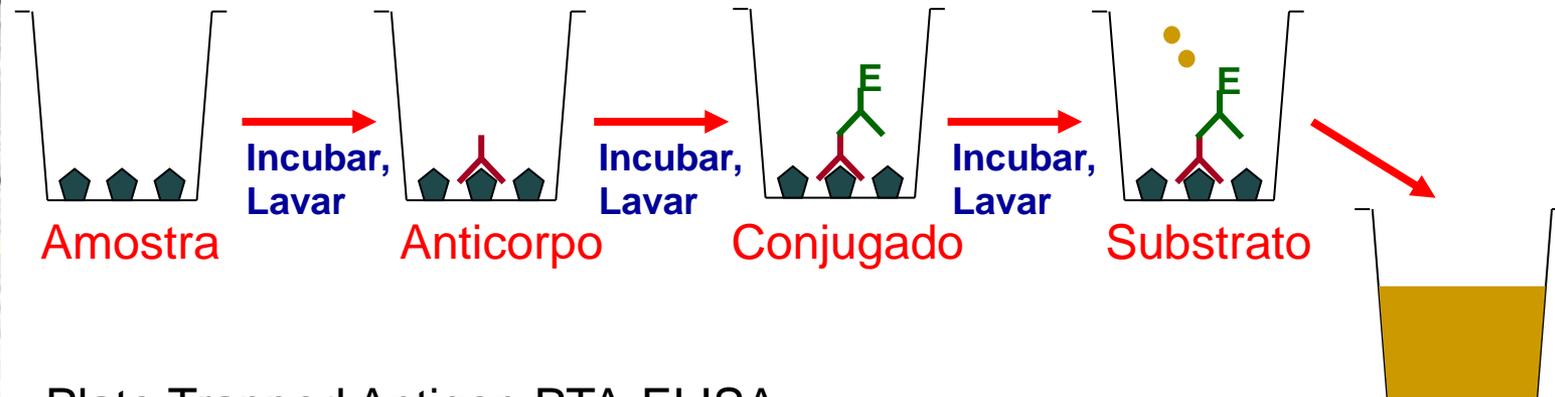
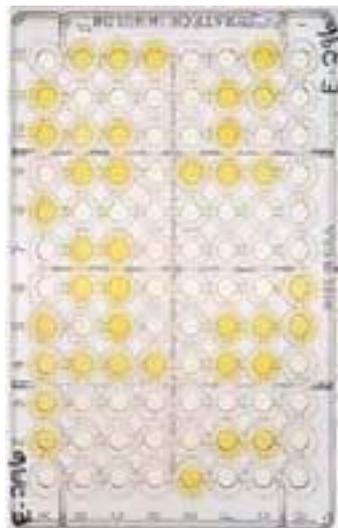


Plate Trapped Antigen PTA-ELISA



INTERPRETAÇÃO DO TESTE DE ELISA

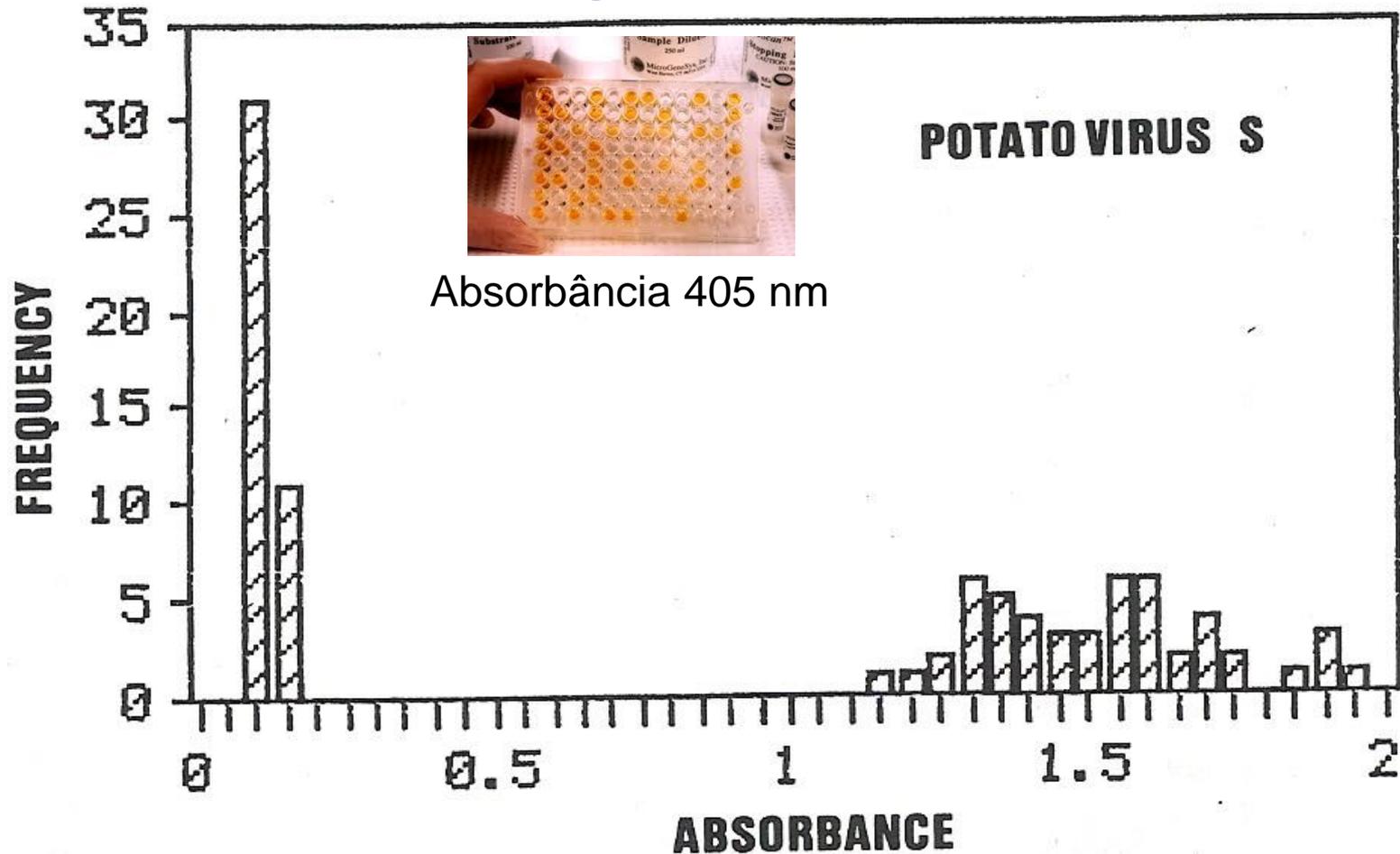


Fig. 1. Histogram of ELISA results for potato virus S in plantlets derived from 90 characterized potato tissue cultures. The bimodal distribution of data is ideal, with a large interval of absorbance separating healthy (negative) plants on the left and diseased (positive) plants on the right.



7. TÉCNICAS MOLECULARES

PCR/RT-PCR

PCR tempo Real

LAMP

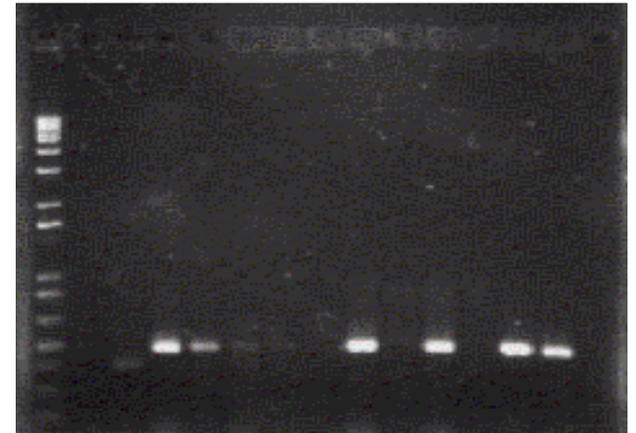
Vantagens: sensibilidade (fentograma, Uma molécula),

rápido e altamente específico (estirpes)

Desvantagens: teste de poucas amostras e

não mede infectividade.

Sequência de nucleotídeos





SEQUENCIAMENTO DE GENOMA COMPLETO



a) Passagem de fitas simples de DNA através minúsculos poros de proteína (nanoporos) em uma membrana de polímero eletricamente resistente.

b) Corrente iônica passa através do nanopore.

Quando uma molécula de DNA passa pelo nanopore a corrente é alterada de maneiras diferentes, dependendo dos nucleotídeos.

c, d) É possível “ler” a sequência de DNA, letra por letra!

