



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE BIOLOGIA
DEPARTAMENTO DE ENTOMOLOGIA E FITOPATOLOGIA
ÁREA DE FITOPATOLOGIA
IB 237 (PATOLOGIA FLORESTAL)

Atualizado em 21/03/2015

Prof. Associado, Dr. Paulo Sergio Torres Brioso (<http://lattes.cnpq.br/8099996221105627>)

DIAGNOSE DE ENFERMIDADES VEGETAIS

1. INTRODUÇÃO

2. SINTOMATOLOGIA

2.1. CONCEITO

2.2. CLASSIFICAÇÃO DE SINTOMAS

2.2.1. CRITÉRIOS UTILIZADOS PARA A CLASSIFICAÇÃO

2.2.2. CLASSIFICAÇÃO MORFOLÓGICA

3. TESTES UTILIZADOS NA DETECÇÃO E DIAGNOSE DE FITOPATÓGENOS

3.1. BIOLÓGICOS

3.2. FÍSICO – QUÍMICOS

3.3. SOROLÓGICOS

3.4. MOLECULARES

4. REGRAS DE PATOGENICIDADE (POSTULADOS DE KOCH)

1. Introdução:

Em Fitopatologia são conhecidos 5 (cinco) períodos:

- Período Místico, da Predisposição, Etiológico, Ecológico e Atual.

Os três últimos períodos foram os quais os testes diagnósticos mais evoluíram.

Existem 2 (dois) tipos de Diagnose:

- **Indireta** – Baseada exclusivamente nos Sintomas
- **Direta** - Baseada nos Sintomas e Sinais

A coleta, acondicionamento e remessa das amostras para análise são atividades de fundamental importância e variam com o tipo de fitopatógeno a ser pesquisado e com o sintoma apresentado pela planta.

2. Sintomatologia:

2.1. Conceito:

É a ciência que estuda os sintomas decorrentes das enfermidades dos vegetais.

2.2. Classificação de Sintomas:

2.2.1. Critérios utilizados para a Classificação:

Na classificação dos sintomas podem ser utilizados os seguintes critérios:

I – Localização dos Sintomas em relação ao agente etiológico

- Sintoma Primário
- Sintoma Secundário

II – Alteração á nível celular (Sintomas Histológicos)

- Granulose
- Plasmólise
- Vaculose

III – Alteração á nível da fisiologia da célula (Sintomas Fisiológicos)

- Respiração
- Transpiração
- Síntese de Carbohidratos
- Síntese de Enzimas
- Síntese de Proteínas

IV – Alteração á nível de anatomia ou forma do Orgão (Sintomas Morfológicos)

2.2.2. Classificação Morfológica (Link):

- Sintomas Necróticos:

São os sintomas que antecedem a morte ou a morte propriamente dita dos tecidos.

- **Plesionecrótico** - Amarelecimento, Anasarca ou Encharcamento, Murcha.
- **Holonecrotico** - Cancro, Canelura ou "Stem Pitting", Crestamento ou Requeima, "Damping Off" ou Tombamento, Escaldadura, Estria ou Listra, Fendilhamento ou Rachadura, Gomose, Mancha, Mumificação, Necrose Vascular, Perfuração, Podridão, Pústula, Resinose, Seca, Seca dos Ponteiros ou "Die Back"

- Sintomas Plásticos:

Envolve um sub ou super-desenvolvimento dos tecidos.

- **Hipoplástico** - Albinismo, Afilamento foliar, Clareamento de Nervura, Clorose, Enfezamento ou Nanismo, Mosaico, Mosqueado, Roseta.
- **Hiperplástico** – Bronzeamento, Calo Cicatricial, Enação, Encarquilhamento ou Encrespamento, Epinastia, Espessamento de Nervura, Fasciação, Galha, Superbrotamento, Verrugose.

2.2.3. Sintoma X Sinal:

- Infecção Latente – Infecção sem apresentar sintoma visível
- Estímulo a Exteriorização do Sinal (Câmara Úmida associada á temperatura ótima)

3. Testes utilizados na Diagnose de Fitopatógenos:

3.1. Testes Biológicos (Exemplos):

- **Iscas Biológicas** (por exemplo: Batatinha, Folha de Mamona, Maçã, Pimentão, Tomateiro, etc) (principalmente, para Bactéria, Fungo) exemplificado através da Instrução Normativa número 28 (MAPA).
- **Enxertia** (principalmente, para patógenos sistêmicos ou de não transmissão mecânica)
- **Plantas Indicadoras** (principalmente, para Vírus e Viróide)
- **Plantas Diferenciadoras** (principalmente, para Fungos, Vírus e Nematóides)
- **Transmissão por Cuscuta sp.** (principalmente, para Vírus e Fitoplasma)
- **Vetor** (Ácaro, Chytrídeo, Inseto, Nematóide, Plasmodiophorideo)

3.2. Testes Físico - Químicos (Exemplos):

I - Microscopia Ótica

- **Lâmina e Lamínula** - Montado em Água (Bactéria, Chytrídeo, Espiroplasma, Fungo, Nematóide, Plasmodiophorideo, Protozoário, Straminipila) ou Corante (Fungo).

- **Secções Histológicas associadas a Corantes Específicos** - Bactéria, Chytrídeo, Espiroplasma, Fitoplasma, Fungo, Nematóide, Plasmodiophorideo, Protozoário, Straminipila, Vírus (agregados protéicos).

II - Microscopia Eletrônica

- **Secções Histológicas associadas a Corantes Específicos** - Bactéria, Chytrídeo, Espiroplasma, Fitoplasma, Fungo, Nematóide, Plasmodiophorideo, Protozoário, Straminipila, Vírus.

III - Eletroforese

- **Proteína** - Bactéria, Chytrídeo, Espiroplasma, Fitoplasma, Fungo, Nematóide, Protozoário, Straminipila, Vírus.
- **DNA e/ou RNA** - Bactéria, Chytrídeo, Espiroplasma, Fitoplasma, Fungo, Nematóide, Plasmodiophorideo, Protozoário, Straminipila, Viróide, Vírus.

3.3. Testes Sorológicos (Exemplos):

- **Difusão Dupla em Gel de Agar**
- **ELISA** (“Enzyme Linked Immunosorbent Assay”) e suas modalidades
- **Imunocromatográfico**
- **“Western Blot”**

Anticorpos específicos contra Proteína (s) - Bactéria, Chytrídeo, Espiroplasma, Fitoplasma, Protozoário, Vírus.

Sendo, atualmente, mais utilizado em Vírus e para alguns gêneros de Bactéria.

3.4. Testes Moleculares (Exemplos):

- **“Northern Blot”**
- **“Southern Blot”**
- **“PCR”** (“Polymerase Chain Reaction”) e suas modalidades

- “**RT – PCR**” (“Reverse Transcriptase - Polymerase Chain Reaction”)
- “**Dot Blot**”
- “**RFLP**” (“Restriction Fragment Length Polymorphism”)
- **Sequenciamento de Nucleotídeos**

Para a diagnose de Bactéria, Chytrideo, Espiroplasma, Fitoplasma, Fungo, Nematóide, Plasmodiophorideo, Protozoário, Straminipila, Viróide, Vírus.

Na Tabela 1 são listados os principais testes adotados na detecção e diagnose dos fitopatógenos

Tabela 1. Principais testes utilizados na detecção e diagnose dos fitopatógenos.

FITOPATÓGENO	PRINCIPAIS TESTES UTILIZADOS NA DETECÇÃO E DIAGNOSE
Bactéria	Exsudação bacteriana, Teste de Enxertia, Teste de Hipersensibilidade em Fumo ou em Tomate, Teste de Isolamento com Plantas Iscas, Transmissão por inseto-vetor (cigarrinha - específico para <i>Xylella</i> sp.); Isolamento em Meio de Cultura, Teste de Crescimento em Meios Específicos, Teste de Gram, Microscopia Ótica, Microscopia Eletrónica de Transmissão; ELISA e suas modalidades, Imunocromatográfico; <i>Dot Blot</i> , <i>Southern Blot</i> , PCR com <i>primers</i> específicos, <i>Bio PCR</i> , <i>multiplex PCR</i> , <i>nested PCR</i> , <i>Real Time PCR</i> , PCR-RFLP, Sequenciamento de nucleotídeos
Chytrideo	Teste de Isolamento com Plantas Iscas; Microscopia Ótica, Microscopia Eletrónica de Transmissão, Microscopia Eletrônica de Varredura; <i>Dot Blot</i> , <i>Southern Blot</i> , PCR com <i>primers</i> específicos, PCR-RFLP,

	Sequenciamento de nucleotídeos
Espiroplasma	Isolamento em Meio de Cultura, Transmissão por inseto-vetor (cigarrinha); Teste de Gram, Microscopia Ótica, Microscopia Eletrônica de Transmissão; ELISA e suas modalidades, Imunocromatográfico; <i>Dot Blot</i> , <i>Southern Blot</i> , PCR com <i>primers</i> específicos, <i>multiplex</i> PCR, <i>nested</i> PCR, Bio-PCR, <i>Real Time</i> PCR, PCR-RFLP, Sequenciamento de nucleotídeos
Fitoplasma	Teste de Enxertia, Transmissão por <i>Cuscuta</i> sp., Transmissão por inseto-vetor (cigarrinha ou psílídeo); Microscopia Ótica com corantes específicos, Microscopia Eletrônica de Transmissão; ELISA e suas modalidades; <i>nested</i> PCR, PCR-RFLP, Sequenciamento de nucleotídeos
Fungo	Isolamento em Meio de Cultura (parasita facultativo), Teste de Inoculação em Plantas Indicadoras ou de Isolamento com Plantas Iscas, Teste de Enxertia; Microscopia Ótica, Microscopia Eletrônica de Transmissão, Microscopia Eletrônica de Varredura; <i>Dot Blot</i> , <i>Southern Blot</i> , PCR com <i>primers</i> específicos ou degenerados, <i>multiplex</i> PCR, PCR-RFLP, Sequenciamento de nucleotídeos
Nematóide	Testes de Inoculação com Plantas Iscas ou Diferenciadoras; Teste de Fragmentação de Material Vegetal, Peneiramento e Baermann em recipiente raso, Microscopia Ótica, Microscopia Eletrônica de Transmissão, Microscopia Eletrônica de Varredura; Eletroforese de Isoenzima; <i>Dot Blot</i> , <i>Southern Blot</i> , PCR com <i>primers</i> específicos ou degenerados, <i>multiplex</i> PCR, PCR-RFLP, Sequenciamento de nucleotídeos
Plasmodiophorídeo	Testes de Inoculação com Plantas Iscas;

	Microscopia Ótica, Microscopia Eletrônica de Transmissão; <i>Dot Blot</i> , <i>Southern Blot</i> , PCR com <i>primers</i> específicos ou degenerados, PCR-RFLP, Sequenciamento de nucleotídeos
Protozoário	Teste de Enxertia, Transmissão por Inseto-Vetor (percevejo); Microscopia Ótica, Microscopia Eletrônica de Transmissão, Microscopia Eletrônica de Varredura;; ELISA e suas modalidades, ISEM, <i>Western Blot</i> ; <i>Dot Blot</i> , <i>Southern Blot</i> , PCR com <i>primers</i> específicos ou degenerados, PCR-RFLP, Sequenciamento de nucleotídeos
Straminipila	Isolamento em Meio de Cultura (parasita facultativo), Teste de Inoculação em Plantas Indicadoras ou de Isolamento com Plantas Iscas; Microscopia Ótica, Microscopia Eletrônica de Transmissão, Microscopia Eletrônica de Varredura; <i>Dot Blot</i> , <i>Southern Blot</i> , PCR com <i>primers</i> específicos ou degenerados, PCR-RFLP, Sequenciamento de nucleotídeos
Viróide	Testes de Transmissão Mecânica (em Plantas Indicadoras ou Diferenciadoras), Teste de Enxertia; Eletroforese em Gel de Poliacrilamida (Bidirecional); <i>Dot Blot</i> , <i>Northern Blot</i> , RT-PCR com <i>primers</i> específicos, <i>multiplex</i> PCR, <i>Real Time</i> PCR, Sequenciamento de nucleotídeos
Vírus	Testes de Transmissão Mecânica (em Plantas Indicadoras ou Diferenciadoras), Teste de Enxertia, Transmissão por <i>Cuscuta</i> sp.; Transmissão por Vetores (ácaro, chytrídeo, inseto, nematoide, protozoário); Microscopia Eletrônica de Transmissão; ELISA e suas modalidades, ISEM, Teste Imunocromatográfico, <i>Western Blot</i> ; <i>Dot Blot</i> ,

	<i>Northern Blot, Southern Blot, PCR ou RT-PCR com primers específicos ou degenerados, Lamp PCR, multiplex PCR, Real Time PCR, RCA, RCA-RFLP, Sequenciamento de nucleotídeos</i>
--	--

4. Regras de Patogenicidade (Postulados de Koch):

Conjunto de regras a se utilizar para estabelecer cientificamente que um fitoparasita é um patógeno.

I - Associação constante sintoma e sinal

II - Isolamento, do organismo observado, em cultura pura

III - Inoculação, de cultura pura do organismo observado, em indivíduo suscetível e sadio

IV - Re-isolamento, do organismo inoculado, em cultura pura

Parasita Facultativo - Bactéria, Espiroplasma, Fungo, Protozoário, Straminipila.

Parasita Obrigatório - Chytrídeo, Fitoplasma, Fungo, Nematóide, Plasmodiophorideo, Viróide, Vírus (Não se realizam os Postulados: Isolamento, do organismo observado, em cultura pura; Re-isolamento, do organismo inoculado, em cultura pura).

BIBLIOGRAFIA RECOMENDADA

A lista bibliográfica para estudo dos tópicos acima listados pode ser acessada no endereço eletrônico <http://www.fito2009.com/fitop/fitopbiblio.htm> ou <http://www.fito2009.com/fitop/fitoppat.htm> ou <http://sites.google.com/site/paulobrioso>