



XL CONGRESSO PAULISTA DE FITOPATOLOGIA Instituto Agronômico - Campinas, SP

7 a 9 de Fevereiro de 2017

DETECÇÃO DO *Banana streak virus* E *Cucumber mosaic virus* EM BANANEIRAS PRESERVADAS SOB DIFERENTES CONDIÇÕES DE ARMAZENAMENTO

Natália Paravati Magalhães^{1*}, Gustavo Francisco dos Santos^{1*}, Maysa Sant'Ana^{1.}; Thiago Pap¹, E. B. RIVAS¹, A. COLARICCIO¹. Instituto Biológico, Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Sanidade Vegetal, São Paulo-SP. colariccio@biologico.sp.gov.br;
*Bolsistas PIBIC/CNPq

RESUMO – As espécies de *Musa* que produzem frutos comestíveis, bananas e plátanos, são economicamente importantes e cultivadas em escala comercial. As grandes áreas cultivadas e a propagação vegetativa das bananeiras propiciam a ocorrência e disseminação de pragas e doenças. Dentre estas, os vírus são patógenos frequentes e podem causar danos às plantas e frutos. No Brasil, apenas as espécies *Banana streak virus* (BSV) e *Cucumber mosaic virus* (CMV) foram descritas, mas merece atenção *Banana bract mosaic virus* (BBrMV) por ser uma praga quarentenária A1. O objetivo do presente trabalho foi detectar a presença de vírus das espécies BSV, CMV e BBrMV em 90 amostras foliares de bananeiras, mantidas sob diferentes formas de armazenamento.

Palavras-chave: *Musa* sp., *Banana streak virus*, *Cucumber mosaic virus*, *Potyvirus*

INTRODUÇÃO

As bananas utilizadas na alimentação, pertencentes ao gênero *Musa*, família Musacea, se desenvolvem a partir de brotações de pseudocauls geradas em um rizoma e seus frutos são desenvolvidos em pencas, por paternocarpia (DANTAS et. al., 1999). Segundo SOUZA e TORRES FILHO (1999) a cultura da banana está presente em todos os estados brasileiros, o que demonstra sua adaptação ao clima nacional.

Inúmeras pragas, como ácaros, insetos, bactérias, fungos, nematoides, vírus e viroides, afetam a cultura da banana, com grande capacidade de devastar a cultura e reduzir a produção. Dentre elas, destacam-se os vírus, pois não possuem controle químico e podem causar significativa redução da produtividade (COLARICCIO et al., 2013).

No Brasil, até o momento, apenas duas espécies de vírus foram relatadas em cultivos comerciais de banana, BSV e CMV. Estes dois vírus induzem sintomas similares, podendo ser confundidos e, com isso, não permitindo a identificação da virose visualmente (SANT'ANA et al., 2016). Sem relato ainda no país, mas que também causa impacto comercial à



XL CONGRESSO PAULISTA DE FITOPATOLOGIA

Instituto Agronômico - Campinas, SP

7 a 9 de Fevereiro de 2017

bananicultura, está o *Banana bract mosaic virus* (BBrMV), gênero *Potyvirus*, uma praga quarentenária A1 (Instrução Normativa 41, de 01/07/2008). O BBrMV é uma espécie do gênero *Potyvirus*, família *Potyviridae*, transmitido por pulgões, que pode causar desde sintomas brandos semelhantes aos induzidos por CMV até mais drásticos causando redução de até 40% na produção de cachos, sintomas esses por vezes atribuídos às infecções mistas envolvendo BBrMV e CMV ou BBrMV e BSV (PIETERSEN & THOMAS, 2001).

O objetivo do presente trabalho foi detectar a presença de vírus das espécies BSV, CMV e BBrMV em 90 amostras foliares de bananeiras, mantidas sob diferentes formas de armazenamento.

MATERIAL E MÉTODOS

Oitenta e nove amostras foliares de bananeiras de oito cultivares, provenientes de 11 municípios do estado de São Paulo e um município do estado do Paraná, foram analisadas para a presença de vírus. Estas amostras estavam armazenadas a -20°C em sacos plásticos, a -18°C em tubos com cloreto de cálcio (CaCl₂) ou sob a forma herborizada.

Extrações de RNA e DNA totais foram realizadas com todas as amostras, de acordo com os métodos de SALZMAN et al. (1999) e DELLAPORTA et al. (1983), respectivamente. Os ácidos nucleicos extraídos foram analisados em gel de agarose por eletroforese horizontal em gel de agarose 1,0% em TAE (Tris + ácido acético glacial + EDTA 0,5 M, pH 8,0).

As RT-PCRs (transcrição reversa do RNA seguida de reação em cadeia da polimerase) foram realizadas com *primers* específicos para CMV (WILEY et al., 1993) e com *primers* dirigidos para o gene da inclusão cilíndrica de *Potyviridae* (HA et al., 2008). Para o controle interno da reação foram utilizados *primers* dirigidos para o gene da desidrogenase NADH mitocondrial (LI & CHANG, 2006). As RTs foram realizadas com reagentes Promega e as PCRs com reagentes NeoBio, de acordo com as instruções dos fabricantes. As PCRs para detecção da presença do BSV foram realizadas com reagentes NeoBio, de acordo com as instruções do fabricante, e *primers* específicos para BSV (HARPER et al., 2002).

Os produtos obtidos foram analisados em em gel de agarose 1,5% em TAE. Após a corrida eletroforética, o gel foi visualizado sob luz UV em transiluminador e documentado.

RESULTADOS E DISCUSSÃO



XL CONGRESSO PAULISTA DE FITOPATOLOGIA

Instituto Agronômico - Campinas, SP

7 a 9 de Fevereiro de 2017

Na tabela 1 estão relacionadas as 90 amostras de folhas de bananeiras, mantidas sob três diferentes condições de armazenamento e avaliadas pela extração de DNA e RNA seguidas de PCR e RT-PCR, respectivamente quanto a preservação do CMV e BSV.

Dentre as 56 amostras foliares armazenadas em sacos plásticos a -20°C , DNAs totais foram obtidos das cultivares 'Nanica' (Sete Barras), 'Prata' (Cajati e Pariquera-Açu) e 'Galil 7' (Jacupiranga) (Tabela 1), todas com sintomas de estrias cloróticas nas folhas; entretanto, somente as amostras de 'Nanica' foram positivas para o BSV (Tabela 1).

Nas amostras provenientes do herbário coletadas para a detecção dos fungos *Mycosphaerella fijiensis* e *M. musicola* e mantidas para fins de controle positivo destes fungos não foram obtidos resultados positivos para os vírus avaliados. Essas amostras eram constituídas por folhas de bananeira herborizadas com sintomas de Sigatoka Amarela e Negra, para fins de preservação do fungo e sem informações sobre a presença de vírus, e por esse motivo não é possível estimar a porcentagem de viabilidade dos vírus nesta forma de armazenamento.

Das 32 amostras foliares de bananeiras desidratadas com CaCl_2 , 12 foram positivas para a extração do DNA e oito para extração do RNA, entretanto apenas em amostras de bananeiras 'Prata', provenientes de Miracatu, o BSV pode ser detectado (Tabela 1).

O armazenamento a -20°C de folhas infectadas mostrou-se adequado para a preservação do BSV, entretanto quanto às amostras armazenadas em CaCl_2 , apesar de ter sido possível detectar o vírus demonstrando ser uma condição viável, para a manutenção do BSV, talvez sejam necessárias avaliações periódicas mais frequentes e com amostras com diagnóstico positivo para o BSV, para avaliar corretamente a eficiência da preservação deste vírus em tecido foliar desidratado.

Um dos pontos críticos para a obtenção de ácidos nucleicos viáveis para a posterior utilização em ensaios moleculares é a trituração da amostra até a sua redução em pó fino e a execução deste procedimento em baixa temperatura. Por esta razão, todas as amostras foram trituradas em presença de nitrogênio líquido; mesmo com esse procedimento houve grande variabilidade na obtenção de ácido nucleico adequado à realização dos ensaios moleculares.

O CMV e o BBrMV não foram detectados em nenhuma das 90 amostras avaliadas. Isto pode ser devido a diversos fatores, como a degradação do RNA, a baixa concentração do vírus no tecido foliar e o fato das amostras não estarem infectadas por estas espécies virais. Além



XL CONGRESSO PAULISTA DE FITOPATOLOGIA

Instituto Agrônômico - Campinas, SP

7 a 9 de Fevereiro de 2017

destes, a não detecção de CMV nas amostras pode ser devido à distribuição irregular deste vírus folhas e plantas de bananeiras, pois foram utilizados tecidos do limbo foliar. Hu e colaboradores (1995) não detectaram o CMV em algumas amostras de folhas de bananeiras que apresentavam sintomas drásticos, e consideraram que a região da folha a ser utilizada no ensaio e a diluição do RNA total obtido aumentam a confiabilidade da detecção do CMV por RT-PCR. Estes autores encontraram que o tecido da nervura principal de folhas jovens de bananeiras é a melhor região para se obter tanto altas leituras de absorbância em ELISA, quanto os melhores resultados em RT-PCR.

Portanto, novas avaliações devem ser feitas com material vegetal infectado e desidratado a fim de se determinar a manutenção da viabilidade do material genético viral.

CONCLUSÃO

O armazenamento de amostras foliares a -20°C foi eficiente na preservação do BSV em diferentes cultivares de bananeira, enquanto para as amostras armazenadas a -20°C em CaCl_2 o material genético do BSV foi preservado apenas na cv. 'Prata' proveniente de Miracatu; outros ensaios devem ser realizados, com materiais sabidamente infectados por BSV e/ou CMV, para a determinação da(s) melhor(es) condições de armazenamento para a preservação de cada uma das espécies de vírus que infectam a bananeira.

Tabela 1. Amostras foliares de bananeiras, mantidas em diferentes condições de armazenamento, e respectivas avaliações moleculares.

Município	Número de amostras	Cultivar	Extração de ácido nucleico*	Armazenamento
Cajati, SP	7	Prata	DNA + / RNA +	
Jacupiranga, SP	12	Galil 7	DNA + / RNA +	
Jacupiranga, SP	6	Gand Naine	DNA - / RNA +	folhas em
Pariquera-Açu, SP	11	Prata	DNA + / RNA +	sacos plásticos
Sete Barras, SP	10	Naniquinha	DNA - / RNA +	a -20°C
Sete Barras, SP	10	Nanica	DNA + / RNA + (BSV +)	
Total de amostras	56			
Cajati, SP	1	Prata	DNA + / RNA +	
Eldorado, SP	1	Nanicão	DNA + / RNA -	
Eldorado, SP	3	Prata	DNA + / RNA -	folhas
Eldorado, SP	1	Nanica	DNA - / RNA +	desidratadas com
Itariri, SP	1	Prata	DNA + / RNA -	CaCl_2
Jacupiranga, SP	3	Prata	DNA + / RNA -	
Jacupiranga, SP	1	Nanica	DNA + / RNA -	
Juquiá, SP	1	Prata	DNA + / RNA +	
Miracatu, SP	5	Prata	DNA + / RNA +	



XL CONGRESSO PAULISTA DE FITOPATOLOGIA

Instituto Agronômico - Campinas, SP

7 a 9 de Fevereiro de 2017

				(BSV +)
Pariquera-Açu, SP	1	Grand Naine	DNA - / RNA -	
Pariquera-Açu, SP	1	Prata	DNA + / RNA -	
Pariquera-Açu, SP	1	Maçã	DNA - / RNA +	
Pariquera-Açu, SP	1	Naniquinha	DNA - / RNA -	
Pariquera-Açu, SP	1	Ouro	DNA - / RNA +	
Pariquera-Açu, SP	3	Nanica	DNA + / RNA +	
Pedro de Toledo, SP	3	Prata	DNA + / RNA +	
Registro, SP	1	Naniquinha	DNA - / RNA -	
Registro, SP	1	Prata	DNA - / RNA -	
Registro, SP	1	Nanica	DNA - / RNA -	
Sete Barras, SP	1	Prata	DNA + / RNA -	
Total de amostras		32		
Antonina, PR	1	Maçã	DNA + / RNA -	folhas
São Paulo, SP	1	Missouri	DNA + / RNA -	herborizadas
Total de amostras		2		

*Avaliação da extração dos ácidos nucleicos, em gel de agarose, onde “+” refere-se à presença de DNA total obtido na amostra e “-” refere-se à ausência de DNA total.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

COLARICCIO, A.; EIRAS, M.; CHAVES, A.L.R. Vírus: patógeno limitante à cultura de bananeira no Brasil. In: NOGUEIRA, E.M.C.; ALMEIDA, I.G.; FERRARI, J.T.; BERIAM, O.T.S. (Eds.). In: Bananicultura – Manejo fitossanitário e aspectos econômicos e sociais da cultura. Instituto Biológico, São Paulo, 1ª ed., p.116-135, 2013.

DANTAS, A.C.V.L.; DANTAS, J.L.L.; ALVES, E.J. Estrutura da Planta. In: ALVES, E.H. A cultura da banana: Aspectos técnicos, socioeconômicos e agroindustriais. 2ª. ed. Brasília, DF: Embrapa, 1999.

DELLAPORTA, S.L.; WOOD, J.; HICKS, J.B. A plant DNA minipreparation: version II. Plant Molecular Biology Reporter, v.1, p.19-21, 1983.

HA, C.; COOMBS, S.; REVILL, P.A.; HARDING, R.M.; VU, M. DALE, J.L. Design and amplification of two novel degenerate primer pairs for the detection and complete genomic characterization of potyviruses. Archives of Virology, v.153, p.25-36, 2008.

HARPER, G.; HART, D.; MOUT, S.; HULL, R. Detection of *Banana streak virus* in field samples of bananas from Uganda. Annals of Applied Biology, v.141, p.247-257, 2002.

HU, J.S.; LI, H.P.; BARRY, K.; WANG, M.; JORDAN, R. Comparison of Dot Blot, ELISA, and RT-PCR assays for detection of two Cucumber mosaic virus isolates infecting banana in Hawaii. Plant Disease, v.79, p.902-906, 2005.

LI, S.-C.; CHANG, Y.-C. Multiplex RT-PCR detection of two orchid viruses with an internal control of plant *nad5* mRNA. Plant Pathology Bulletin, v.15, p.187-196, 2006.

PIETERSEN, G.; THOMAS, J.E. Overview of *Musa* virus diseases. Proceedings of a Conference Organize by IITA. Plant Virology in Sub-Saharan Africa, p.50-60, 2001.



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

SALZMAN, R.A.; FUJITA, T.; ZHU-SALZMAN, K.; HASEGAWA, P.M.; BRESSAN, R.A. An improved RNA isolation method for plant tissues containing high levels of phenolic compounds or carbohydrates. *Plant Molecular Biology Reporter*, v.17, p.11-17, 1999.

SANTANA, M; MORAES, W.S.; EIRAS, M.; CHAVES, A.L.R.; RIVAS, E.; HARAKAVA, R.; COLARICCIO, A. Detecção do *Cucumber mosaic virus* (CMV) e *Banana streak virus* (BSV) em *Musa* spp. em cultivo convencional e orgânico no Vale do Ribeira, São Paulo, Brasil. *CONVIBRA*, v.3, p.154-165, 2016.

SOUZA, J.S.; TORRES FILHO, P. Aspectos socioeconômicos. In: ALVES, E.J. A cultura da banana: Aspectos técnicos, socioeconômicos e agroindustriais. 2ª. ed. Brasília, DF: Embrapa, 1999.

WYLIE, S.; WILSON, C.R.; JONES, R.A.C.; JONES, M.G.K. A polymerase chain reaction assay for Cucumber mosaic virus in lupin seeds. *Australian Journal Agricultural Research*, v.44, p.41-51, 1993.