

Documentos

ISSN 1517-5111
ISSN online 2176-5081
Outubro, 2009

274

Cultura de Tecidos no Controle de Virose da Bananeira no Brasil



ISSN 1517-5111

ISSN online 2176-5081

Outubro, 2009

*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Cerrados
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

Documentos 274

Cultura de Tecidos no Controle de Viroses da Bananeira no Brasil

*Sebastião Pedro da Silva Neto
Marília Santos Silva*

Embrapa Cerrados
Planaltina, DF
2009

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Cerrados

BR 020, Km 18, Rod. Brasília/Fortaleza

Caixa Postal 08223

CEP 73310-970 Planaltina, DF

Fone: (61) 3388-9898

Fax: (61) 3388-9879

<http://www.cpac.embrapa.br>

sac@cpac.embrapa.br

Comitê de Publicações da Unidade

Presidente: *Fernando Antônio Macena da Silva*

Secretária-Executiva: *Marina de Fátima Vilela*

Secretária: *Maria Edilva Nogueira*

Supervisão editorial: *Jussara Flores de Oliveira Arbués*

Equipe de revisão: *Francisca Eljani do Nascimento*

Jussara Flores de Oliveira Arbués

Assistente de revisão: *Elizelva de Carvalho Menezes*

Normalização bibliográfica: *Paloma Guimarães Correa de Oliveira*

Editoração eletrônica: *Leila Sandra Gomes Alencar*

Capa: *Leila Sandra Gomes Alencar*

Foto(s) da capa: *Sebastião Pedro da Silva Neto*

Impressão e acabamento: *Divino Batista de Sousa*

Alexandre Moreira Veloso

1ª edição

1ª impressão (2009): tiragem 100 exemplares

Edição online (2009)

Todos os direitos reservados

A reprodução não-autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei no 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Embrapa Cerrados

S586c Silva Neto, Sebastião Pedro da.

Cultura de tecidos no controle de viroses da bananeira no Brasil/
Sebastião Pedro da Silva Neto, Marília Santos Silva. – Planaltina, DF :
Embrapa Cerrados, 2009.

29 p. – (Documentos / Embrapa Cerrados, ISSN 1517-5111, ISSN
online 2176-5081 ; 274).

1. Fruta tropical. 2. Banana. 3. Doença de planta – vírus. I. Silva,
Marília Santos. II. Título. III. Série.

634.772 - CDD 21

© Embrapa 2009

Autores

Sebastião Pedro da Silva Neto

Engenheiro Agrônomo, Ph.D.

Pesquisador da Embrapa Cerrados

sebastiao.pedro@cpac.embrapa.br

Marília Santos Silva

Engenheira Agrônoma, Ph.D.

Pesquisadora da Embrapa Cerrados

marilia@cpac.embrapa.br

Apresentação

A bananeira (*Musa* spp.) ocupa papel de destaque entre as espécies cultivadas, possuindo importância econômica e social para muitos países tropicais e subtropicais. O Brasil ocupa o quarto lugar entre os maiores produtores e detém a segunda maior área de cultivo. O consumo *per capita* de bananas no Brasil é um dos mais altos do mundo e cerca de 98 % da produção é destinada ao mercado interno. As condições edafoclimáticas brasileiras fazem da cultura da banana uma alternativa econômica importante para os produtores de várias regiões brasileiras, tendo em vista atender demandas dos mercados interno e externo.

Os vírus estão entre os principais problemas fitossanitários que limitam a produção da banana em várias regiões do mundo, tornando-se ultimamente o principal entrave para a livre movimentação internacional de germoplasma dessa espécie. As doenças causadas por vírus recebem atenção especial dos órgãos de defesa vegetal por serem de difícil controle, muitas vezes requerendo a erradicação. Os vírus têm como uma das principais formas de dispersão a utilização inadvertida de material propagativo contaminado.

A cultura de tecidos, associada a procedimentos de indexação, termoterapia, quimioterapia, crioterapia e cultura de meristemas, representa alternativa tecnológica importante para a produção de

material propagativo sadio. E permite controlar a disseminação de vírus na cultura da banana no Brasil.

Este trabalho ressalta a importância do adequado emprego de tais técnicas, com especial ênfase à necessidade da escolha correta do procedimento de indexação a ser utilizado para cada vírus. E sugere procedimentos de manejo que evitem a re-infecção das mudas.

José Robson Bezerra Sereno
Chefe-Geral da Embrapa Cerrados

Sumário

Introdução.....	9
Limpeza Clonal.....	11
Produção de Mudanças Clonadas em Larga Escala.....	12
Indexação de Matrizes	13
Métodos de Indexação	14
Teste Elisa	14
Testes baseados em <i>Polymerase Chain Reaction</i> (PCR)	16
Escolha do Tecido Amostral.....	18
Viroses a serem indexadas	18
<i>Cucumber Mosaic Virus</i> (CMV)	18
<i>Banana Streak Virus</i> (BSV)	19
<i>Banana Bunch Top Virus</i> (BBTV)	21
<i>Banana bract mosaic virus</i> (BBrMV)	21
<i>Banana mild mosaic virus</i> (BanMMV)	22
<i>Banana die-back virus</i> (BDBV).....	22
<i>Abaca mosaic virus</i> (AbaMV)	23
Controle de Qualidade Pós-laboratório	23
Durante a aclimação	23
Durante o estabelecimento inicial de bananais no Brasil.....	24
Considerações Finais	24
Referências	26
Abstract	29

Cultura de Tecidos no Controle de Viroses da Bananeira no Brasil

Sebastião Pedro da Silva Neto

Marília Santos Silva

Introdução

A bananeira (*Musa* spp.) é considerada uma das fruteiras mais importantes do mundo. A banana, com produção anual de 86 milhões de toneladas, representa a principal fonte de carboidratos para centenas de pessoas ao redor do mundo. O Brasil cultivou, no ano 2007, uma área de 515.346 ha, e é o quarto produtor mundial de bananas, com produção de 7.098.350 toneladas. Em virtude de problemas de ordem fitossanitária, a produtividade brasileira é considerada baixa (13.774 kg/ha) perante os principais países produtores. A banana tem grande importância econômica e social no Brasil, sendo a fruta mais consumida no País na forma in natura, com consumo *per capita* de 36,8 kg/ano (FAOSTAT Database, 2009).

Entre os problemas fitossanitários que podem causar grandes perdas para a cultura da banana, estão as viroses. Segundo Ploetz et al. (2003), mundialmente a bananeira é acometida por sete vírus: *Banana bunchy top virus* (BBTV), *Cucumber mosaic virus* (CMV), *Banana streak virus* (BSV), *Banana bract mosaic virus* (BBrMV), *Banana mild mosaic virus* (BanMMV), *Banana die-back virus* (BDBV) e *Abaca mosaic virus* (AbaMV), que podem comprometer de forma significativa a

produtividade e viabilidade econômica da cultura. A distribuição desses vírus encontra-se na Tabela 1, conforme Frison e Sharrock (1998) e Thomas et al. (2000), dos quais CMV e BSV estão oficialmente presentes no território brasileiro (CORDEIRO et al., 2004); embora o serviço de quarentena tenha detectado outros em lotes de mudas importadas (MARINHO; BATISTA, 2005), indicando o iminente risco de introdução de outras viroses.

A técnica da cultura de tecidos tem sido aplicada na eliminação de viroses em muitas culturas, especialmente em espécies propagadas vegetativamente, como é o caso da bananeira (RAZDAN, 2003). Pelo fato de a bananeira ser acometida por grande número de viroses, que podem causar impactos significativos na cultura, essa ferramenta assume papel importante na bananicultura moderna, com vistas à manutenção e propagação de mudas de alta qualidade fitossanitária.

A cultura de meristemas, associada à termoterapia, quimioterapia e crioterapia, tem sido fundamental para a manutenção da sanidade de germoplasmas, bem como para a limpeza de genótipos importantes em programas de melhoramento. Esses protocolos devem ser utilizados rotineiramente nos laboratórios de clonagem *in vitro* para estabelecer e manter uma coleção de explantes livres de vírus, a partir dos quais se possa fazer a produção, em larga escala, de mudas certificadas. A termoterapia consiste na exposição da planta ou parte dela a altas temperaturas por um período de tempo determinado. Temperaturas entre 30 °C e 40 °C podem inativar ou inibir a sua multiplicação, facilitando a excisão de um meristema limpo (RAZDAN, 2003). A exposição da planta matriz a compostos químicos (quimioterapia) como o ribavirin e ditiouracil, em associação ao cultivo de meristemas, tem sido promissora para a eliminação de vírus (TORRES et al., 1998). A utilização de protocolos de criopreservação para a erradicação de vírus é relatada como crioterapia, obtendo-se sucesso em alguns casos (HELLIOT et al., 2002).

Tabela 1. Víruses, agentes causais e distribuição geográfica.

Vírose	Agente causal	Distribuição geográfica
<i>Abaca mosaic</i>	<i>Potyvirus</i> , possivelmente uma estirpe do mosaico da cana de açúcar	Ásia (Filipinas) e Austrália
<i>Banana bract mosaic</i>	<i>Banana bract mosaic potyvirus</i>	Ásia (Filipinas, Índia, Sri Lanka)
<i>Banana bunch top</i>	<i>Banana bunch top virus</i>	África, Ásia e Oceania
<i>Banana mosaic</i>	<i>Cucumber mosaic virus</i>	Todos os continentes
<i>Banana streak</i>	<i>Banana streak badnavirus</i>	Todos os continentes
<i>Banana die-back</i>	<i>Banana die-back virus</i>	África (Nigéria, Benin, Ghana)
<i>Banana mild mosaic</i>	<i>Banana mild mosaic virus</i>	Todos os continentes ¹

Fonte: modificado de Frison e Sharrock (1998); ¹ Thomas et al. (2000)

Como cada uma das viroses conhecidas que afetam a bananeira difere em suas propriedades moleculares e biológicas, as técnicas utilizadas para seu efetivo manejo e controle também diferem. Adicionalmente, o sucesso do controle dessas doenças virais depende da disponibilidade de métodos confiáveis de detecção de vírus bem como da correta apreciação do risco que cada uma representa.

Limpeza Clonal

A excisão do meristema e a regeneração de plântulas em meios de cultura enriquecidos com reguladores de crescimento têm permitido a propagação de mudas livres de viroses e patógenos sistêmicos. O meristema da bananeira, que tem ao redor de 0,1 mm em diâmetro e 0,25 mm de comprimento, é composto de células indiferenciadas e em crescimento ativo, localizadas nos ápices de gemas e raízes. Esses tecidos não são vascularizados e são, conseqüentemente, menos susceptíveis à infecção por viroses sistêmicas. Os explantes, em cultura de tecidos, constituem-se na base para a rápida multiplicação de mudas e para procedimentos de termoterapia e quimioterapia que aumentam a eficiência da eliminação de vírus (GRIFFITHS et al., 1990). Os protocolos técnicos aproveitam as condições estéreis nas quais as

plantas in vitro crescem e o reduzido espaço para tratar as plântulas e manter o padrão juvenil das mesmas, de forma a obter explantes livres de vírus.

A multiplicação in vitro dos explantes, assim obtidos, proporciona a produção de grande quantidade de mudas sadias, que, ao serem disponibilizadas aos produtores, geram maiores produtividades e melhoraram a rentabilidade da bananicultura como negócio (ALVES et al., 2004). Em geral mudas de banana produzidas por cultivo in vitro se estabelecem mais rapidamente no campo; crescem com mais vigor; têm um ciclo de produção mais curto e uniforme e apresentam maior produtividade e qualidade de frutos quando comparadas com as mudas convencionais. Os ganhos de produtividade são de 30 % em média (VUYLSTEKE, 1998).

A erradicação de viroses de banana utilizando cultura de meristema associada com termoterapia, quimioterapia e crioterapia foi abordada por Helliot et al (2002). Para CMV, termoterapia e crioterapia resultaram na eliminação do vírus em 70 % a 77 % das plântulas, respectivamente, enquanto, para BSV, cultura de meristemas e termoterapia resultaram na eliminação de vírus em 37 % a 48 % das mudas (HELLIOT et al., 2001). Os mesmos autores relatam que o uso de meristemas proliferativos, termo, quimio e crioterapia resultou na erradicação do BSV em até 90 % das mudas. Já para BBTv, encontraram que a erradicação pode ser muito mais efetiva, tendo-se conseguido mais de 89 % de erradicação em plântulas in vitro, utilizando-se somente a cultura de meristemas.

Produção de Mudas Clonadas em Larga Escala

Para o caso da multiplicação in vitro em larga escala (Fig. 1), as matrizes de bananeiras são indexadas antes da fase de estabelecimento in vitro. Nesse caso, somente as matrizes que se mostrarem limpas pela indexação são clonadas. Entretanto, no caso de programas de melhoramento genético, em que é necessária a recuperação de

genótipos importantes, as ferramentas da cultura de tecidos podem ser associadas a outras estratégias, como as citadas no parágrafo anterior, para a limpeza de viroses pré-existentes no material.



Foto: S.P. da Silva Neto

Fig. 1. Multiplicação in vitro de mudas de bananas após indexação

Indexação de Matrizes

Para detectar a presença ou ausência de vírus, realizam-se testes chamados de indexação de viroses. As matrizes de bananeiras devem ser selecionadas de acordo com sua caracterização genética e desempenho agrônômico, obtido a partir do histórico da produção da planta. Depois de devidamente caracterizadas, as plantas eleitas devem ser indexadas para todos os vírus que afetam a cultura da banana na região e, se possível, para todos os vírus já detectados na bananeira em outras partes do mundo (Tabela 1). Somente as plantas que se mostram isentas de vírus pela indexação devem ser utilizadas como matrizes visando à produção de mudas por clonagem em larga escala. Se possível, as matrizes indexadas devem ser mantidas sob condições de telado antiaérfico para evitar a recontaminação com viroses existentes no ambiente. Para assegurar esse estado de limpeza, as matrizes devem ser reindexadas periodicamente e especialmente antes de se fazer a coleta de explantes.

Métodos de Indexação

A eficiência da indexação depende do método de detecção adotado, da diversidade genética do vírus e do método de amostragem utilizado. Técnicas de detecção por sorologia e sondas de ácidos nucleicos podem ser utilizadas para indexação de vírus em bananeiras com segurança. A análise visual pode levar a interpretações erradas uma vez que estirpes fracas ou víroses em estádios iniciais podem nem sequer apresentar sintomas. Por isso, testes laboratoriais são necessários para um diagnóstico preciso. Entre esses, os testes baseados em sorologia (Elisa, Dot Blot) e Reação da polimerase em cadeia (PCR) são os mais utilizados na prática.

Teste Elisa

O teste Enzyme-linked Immunosorbent Assay (Elisa) é uma técnica sorológica que se baseia na especificidade do reconhecimento do antígeno do vírus por anticorpos, produzindo reação de mudança de coloração ou grau de absorvância nas amostras positivas, sendo eficiente, rápido e permitindo testar um grande número de amostras por vez (TORRES et al., 1998). A mudança de coloração é proporcional à concentração de antígeno, desde que todos os passos da realização do teste sejam cumpridos dentro de um padrão pré-estabelecido. A avaliação do resultado do teste Elisa é dependente do grau de absorvância da amostra, que, em última análise, correlaciona-se com a cor da amostra, mediante a leitura da densidade óptica por espectrofotometria em leitora de microplacas (Fig. 2). Sua avaliação é feita comparando a leitura (absorvância) da amostra com leituras de padrões negativos (plantas sadias) e positivos (plantas contaminadas).

Um fator essencial para a fidelidade do teste Elisa é a inclusão, na mesma placa de leitura, de várias amostras-controle contendo material sadio e infectado. Em virtude de a identificação de amostras positivas depender dos valores relativos de absorvância obtidos nas amostras padrão negativo (controles), é fundamental que estas sejam de alta qualidade e confiabilidade. A absorvância para todas as amostras negativas (controles negativos) deve ser determinada, e suas respectivas médias e variâncias usadas para estabelecer os limites

decisórios do valor de absorbância indicativo do ponto de corte entre amostras positivas e negativas.



Fotos: S. P. da Silva Neto

Fig. 2. Indexação de matrizes de bananeiras pelo teste Elisa; preparação de amostras (esquerda) e visualização de uma placa mostrando duas células com reação positiva (direita).

De acordo com Sutula et. al. (1986), o estabelecimento do limite decisório entre o que é positivo e o que é negativo em um teste Elisa é um problema crucial na montagem e avaliação do teste. Infelizmente, em alguns casos, o problema não é levado em consideração por alguns laboratórios de indexação, fazendo com que a tomada de decisão entre positivo-negativo permaneça altamente empírica, podendo induzir a erros e comprometer o resultado do Elisa. Para minimizar erros, esses autores sugerem que seja utilizada uma população de amostras-padrão reconhecidamente negativas e positivas e que seus resultados de absorbância sejam comparados a fim de fornecer resultados que estatisticamente não incorram em falsos positivos e (ou) falsos negativos. O uso comum de limites decisórios pré-fixados pode comprometer a confiabilidade do teste.

Tendo em vista essas limitações, a experiência prática na indexação de víruses em bananeiras permite dizer que o teste Elisa somente é adequado e confiável para esta espécie, quando os cuidados a seguir são tomados:

- Testar quantidade suficiente de plantas para tornar-se familiar com a faixa de absorbância dos resultados negativos e determinar o intervalo de confiança do limite decisório.

- Incluir quantidade suficiente de amostras negativas (controle) em cada teste realizado para assegurar representatividade da faixa de absorvância negativa previamente estabelecida.
- Sempre incluir um controle positivo.
- Encontrar amostras controle e testar as amostras quanto ao tipo de hospedeiro, tecido analisado, idade e posição dentro da placa de análise.
- É altamente recomendável a repetição das amostras.
- Os resultados devem ser fornecidos citando claramente o limite decisório positivo-negativo utilizado para a tomada de decisão.
- Reagentes devem ser bem estocados e utilizados com concentrações específicas para a planta (no caso bananeira), previamente estabelecidas por ampla experimentação.
- O teste deve ser executado por pessoas bem treinadas (exatidão das pipetagens).
- Os resultados devem ser interpretados com base em limites decisórios positivo-negativo bem estabelecidos para a cultura (banana).

Testes baseados em *Polymerase Chain Reaction* (PCR)

O processo chamado *Polymerase Chain Reaction* – PCR (Reação da polimerase em cadeia) é uma metodologia de análise relativamente simples e muito sensível para a detecção de vírus, no qual um número virtualmente ilimitado de cópias de fragmentos selecionados de DNA pode ser gerado em um período curto de tempo (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998). Baseia-se na amplificação enzimática de sequências específicas de DNA ou RNA (via RT-PCR), envolvendo três passos que se repetem ciclicamente: (1) desnaturação do DNA, a 92 °C – 94 °C; (2) anelamento do primer, a 40 °C – 60 °C; (3) extensão

do primer, a 72 °C. O método é catalizado por uma DNA polimerase termo-estável (geralmente Taq DNA polimerase de *Thermus aquaticus*). O resultado é analisado por meio de eletroforese.

De acordo com Delanoy et al. (2003), o ácido nucleico do vírus pode ser detectado por meio de PCR, que amplifica sequências do genoma viral e permite sua visualização após eletroforese. As sequências amplificadas podem ser posteriormente identificadas utilizando sondas de DNA específicas para o vírus em questão. Por isso, o método é acurado, uma vez que detecta sequências nucleotídicas específicas dos vírus alvo. A detecção por PCR é muito útil para vírus que são difíceis de purificar e estão presentes em quantidades mínimas nos hospedeiros.

Já a técnica PCR multiplex foi desenhada para detectar várias sequências-alvo (mais de um vírus) numa mesma amplificação e podem detectar diversos vírus ao mesmo tempo. Os métodos baseados em PCR são, em geral, utilizados para indexar estoques iniciais de matrizes de bananeira quando a acurácia é altamente relevante. A utilização dessa técnica não tem se mostrado adequada para todas as viroses que acometem a bananeira. No caso do BSV, seus resultados tem se mostrado erráticos. Outra limitação da técnica é o fato de não ser quantitativa. Para tanto, faz-se necessário desenvolver metodologias para detecção de vírus de bananeira por PCR em tempo real.

Para detecção de vírus de genoma RNA, é necessária uma etapa prévia à PCR, de transcrição reversa (*reverse transcription*, RT) da sequência alvo de RNA, para gerar um fragmento de cDNA (DNA complementar) molde para a PCR. Portanto, nesse caso, a técnica denomina-se RT-PCR, e tem tido sua utilização implementada na diagnose molecular de vírus, cujo material genético seja RNA, por não requerer procedimentos trabalhosos, evitar as contaminações, e ser viável em experimentos de larga escala. Le Provost et al. (2006) implementaram a técnica M-IC-PCR (Multiplex-Immucapture-PCR) para a detecção de BSV, cujas sequências homólogas estão presentes no hospedeiro.

Escolha do Tecido Amostral

Um passo importante na indexação de bananeiras é a adequada escolha da parte do tecido vegetal a analisar, uma vez que a concentração de partículas virais na planta varia de acordo com o vírus. Por exemplo, nervuras centrais das folhas devem ser utilizadas para BBTv, brácteas devem ser escolhidas no caso de BBrMV e a segunda folha a partir do topo no caso de BSV (UMA et al., 2002). Alguns autores preferem utilizar amostras de folhas velhas para BSV. No caso de CMV, a distribuição é variável entre folhas da mesma planta, ou mesmo entre partes da mesma folha. A experiência prática tem mostrado que os tecidos do limbo próximos à nervura central são mais adequados para detecção de CMV.

Víroses a serem indexadas

No Brasil, até o momento somente CMV e BSV têm sido relatados afetando a cultura da banana. Entretanto todo cuidado deve ser tomado quanto à indexação também das outras viroses que afetam a bananeira em âmbito mundial, tendo em vista o grande fluxo de mudas importadas que tem entrado no Brasil, oriundas de laboratórios localizados na África, Europa, Ásia e América Central, regiões onde todas as viroses estão presentes (Tabela 1). O serviço de quarentena vegetal brasileiro tem detectado BSV e BBrMV em lotes de mudas importadas (FIGUEIREDO et al., 2003; MARINHO; BATISTA, 2005).

Cucumber Mosaic Virus (CMV)

O complexo de sintomas provocados pelo CMV em bananeiras recebe o nome de mosaico-da-bananeira. A doença foi descrita pela primeira vez na Austrália em 1930 (CORDEIRO et al., 2004). Desde então, ela tornou-se largamente disseminada pelo mundo, e atualmente considera-se que seja encontrada em todas as regiões onde se cultiva banana. No Brasil, a doença tem apresentado surtos em bananais jovens localizados no Vale do São Francisco. É um dos vírus mais comuns na natureza, com mais de 800 hospedeiros conhecidos (FIGUEIREDO; BRIOSO, 2007). Por isso, em condições onde a população de vetores é alta, e existem bananais em formação, a doença

se instala. Os principais vetores do CMV são os pulgões *Aphis gossypii*, *Myzus persicae* e *Rhopalosiphum* spp. Os sintomas variam de lesões na forma de mosaico que se concentram no terço médio do limbo foliar (Fig. 3A), podendo causar necroses conforme a idade da planta e grau de infestação. Quando ocorre em mudas muito jovens, pode provocar a morte da planta. O agente causal pertence ao gênero *Cucumovirus*, possui partículas esféricas com 28 nm a 30 nm de diâmetro e genoma RNA fita simples. Sua detecção pode ser feita por meio de Elisa, porém a utilização de RT-PCR é mais sensível (LOCKHART; JONES, 2000). O CMV não é considerado um vírus quarentenário porque sua ocorrência encontra-se disseminada pelo mundo. Entretanto a introdução de novas estirpes em determinados ambientes deve ser evitada sob pena de ocorrência de danos severos, em caso de introdução de estirpes mais virulentas (BOUHIDA; LOCKHART, 1990).

Para o caso de ser necessária a limpeza clonal de material elite contaminado com CMV, a cultura de meristemas simplesmente não se mostra eficiente. Entretanto, Helliot (2003) relata que a cultura de meristemas associada com quimioterapia e crioterapia resultaram em eliminação do vírus em 70 % a 77 % dos casos, respectivamente.

Banana Streak Virus (BSV)

A interação BSV-bananeira é uma complexa interação patógeno-hospedeiro. O vírus BSV pertence ao gênero *Badnavirus* e apresenta genoma DNA circular fita dupla. O BSV foi observado pela primeira vez na Costa do Marfim em 1966. É transmitido pelas cochonilhas *Planococcus citri* e *Saccharicoccus sacchari*. O sintoma mais característico da infecção é a presença de manchas escuras perpendiculares à nervura principal das folhas (Fig. 3B). Os sintomas podem variar de leves a drásticos, dependendo do estado fisiológico da planta hospedeira e da interação com outros vírus como BBrMV (PIETERSEN; THOMAS, 2001). O material genético de BSV possui a habilidade de se integrar ao genoma da bananeira (LOCKHART; JONES, 2000). A inserção e presença do BSV (genoma completo) no genoma B (*Musa balbisiana*) já foi comprovada (PLOETZ et al, 2003). Por esse fato, argumenta-se ser muito difícil encontrar um clone de

bananeira que não esteja infectado por BSV, sobretudo em cultivares que possuem em sua constituição genética o genoma B, como as cultivares Maça, Prata, Terra e a maioria dos híbridos. A presença do genoma completo de BSV inserido no genoma da bananeira não implica em dizer que esse material esteja contaminado; mas simplesmente que o BSV está presente no genoma daquela variedade e que por isso ela é passível de ter uma infecção epissomal. A infecção epissomal é desencadeada normalmente por estresses aos quais a planta é submetida; entre eles, o causado pelo cultivo *in vitro*, ou associações com outras viroses (LOCKHART, 1995).



Fotos: S.P. da Silva Neto

Fig. 3. Folha de bananeira adulta com sintomas de CMV (A) e BSV (B).

A indexação do BSV tem se mostrado complicada e passível de resultados equivocados. Tem havido uma tendência de utilizar o método PCR em detrimento do Elisa. Entretanto, a utilização da técnica básica de PCR para indexação de BSV não tem se mostrado adequada, tendo em vista a falta de repetibilidade dos resultados. Além disso, o resultado positivo obtido por PCR pode não significar patogenicidade, porque o vírus pode estar integrado no genoma vegetal e não se replicar e causar doença.

Em virtude de sequências do DNA do BSV estarem integradas no genoma da bananeira, no caso de não haver replicação viral, o vírus somente é detectado por PCR e não por testes sorológicos. No caso de haver replicação viral, tanto PCR quanto métodos sorológicos podem detectar o BSV. Assim, um resultado de detecção de BSV positivo por PCR e negativo por Elisa indica que há integração, mas

não há replicação que resulte em doença. Por isso, o uso da técnica PCR normal não se presta para diagnosticar a presença de infecção epissomal ou mesmo infecção natural por BSV; sendo que Le Provost et al. (2006) indicam a técnica Immunocapture-Polimerase Chain Reaction (IC-PCR) como a mais indicada para diagnose de BSV.

Para a eliminação do BSV em materiais propagativos iniciais, as técnicas da cultura de meristema e termoterapia resultaram na eliminação do vírus em 37 % a 48 % das mudas. Entretanto, usando meristemas proliferativos, termo, quimio e crioterapia, resultaram na erradicação do BSV em 69 % a 90 % das plantas (HELLIOT et al., 2001).

Banana Bunch Top Virus (BBTV)

Dos vírus que afetam a bananeira, BBTV é o mais sério, podendo ter um efeito devastador nas lavouras (DALE, 1987), sendo a maior ameaça à produção de bananas em vários países da Ásia. Ainda não foi detectado no continente americano. O primeiro relato da ocorrência desse vírus se deu em Fiji em 1889, embora existam evidências anteriores (THOMAS; ISKRA-CARUANA, 2000). Seu potencial de destruição é alto, tendo sido responsável por reduções na produção da ordem de 55 % a 95 % (THOMAS et al., 2000). A transmissão é feita pelo pulgão da bananeira (*Pentalonia nigronervosa*) e por material propagativo contaminado (PLOETZ et al., 2003). Encontra-se disseminado pelos continentes da Ásia, África, incluindo Egito, e Oceania, conforme Tabela 1. A indexação tem sido feita por Elisa ou por PCR.

Para a limpeza de material contaminado com BBTV, a cultura de meristemas se mostrou eficiente. Helliott et al. (2001) relatam que a erradicação do vírus foi acima de 90 %, obtida usando somente cultura de meristemas.

Banana bract mosaic virus (BBrMV)

BBrMV foi detectado em 1979 pela primeira vez nas Filipinas (THOMAS et al., 2000). Seu agente causal é um potyvirus. É transmitido de forma não persistente pelos afídeos *Aphys gossypii* e *Rhopolasiphum maidis*. Forma estrias cloróticas nas folhas e brácteas. Provoca a disposição

em leque das folhas e redução do tamanho dos frutos. As frutas com o sintoma desse vírus não granam e são rejeitadas para o comércio. Ele tem provocado perdas da ordem de 40 % da produção nas Filipinas. Encontra-se disseminado pela Ásia e Oceania. Está incluído na lista de vírus de importância quarentenária não ocorrente no Brasil. Pode ser detectado por Elisa ou por PCR. No ano 2005, o serviço de quarentena brasileiro detectou a presença desse vírus em lotes de mudas importadas e determinou a destruição das mesmas, por se tratar de praga quarentenária (MARINHO; BATISTA, 2005). Até o presente momento, não existem relatos de limpeza clonal em BBrMV.

Banana mild mosaic virus (BanMMV)

Possui ocorrência amplamente disseminada em todos os continentes (THOMAS et al., 2000). Sua sintomatologia é variável, podendo resultar em perdas significativas na produtividade. BanMMV possui partículas em filamentos longos de 580 nm x 14 nm, com genoma RNA fita simples de 7.4 kb. Possui propriedades comuns com o gênero *Potexvirus*, mas não todas. A detecção inicial era feita por microscopia eletrônica, mas posteriormente desenvolveu-se antissoros para Elisa, e primers para RT-PCR. A limpeza clonal de BanMMV ainda não foi relatada.

Banana die-back virus (BDBV)

Agente causal sorologicamente relacionado com o gênero *Nepovirus*. Foi detectado pela primeira vez na Nigéria em 1996 (HUGHES; THOMAS, 2000). Posteriormente, os sintomas foram também observados na República do Benin e em Gana. Seus sintomas incluem clorose foliar, necrose marginal das folhas e morte da folha “vela”. Os seguidores tornam-se progressivamente mais afetados e a planta mãe pode chegar a morrer. O agente causal, que consiste de partículas virais isométricas de 28 nm de diâmetro, ainda não foi totalmente caracterizado, por esse motivo a indexação é difícil e o risco de disseminação desse vírus para outros países fora da África é alto (PLOETZ et al, 2003). Não há relatos de erradicação do BDBV em tecidos vegetais contaminados por meio de limpeza clonal.

Abaca mosaic virus (AbaMV)

Abaca mosaic virus (AbaMV) é relacionado a membros do gênero *Potyvirus* pertencentes ao subgrupo do vírus do mosaico da cana-de-açúcar (SCMV). É um vírus filamentososo de 680 nm de comprimento. O primeiro relato de AbaMV foi feito nas Filipinas em 1925, infectando a cultura da Abacá. Em seu leque de hospedeiros incluem-se muitas espécies da família das gramíneas, e das musáceas, inclusive muitas variedades de bananeiras (THOMAS; MAGNAYE, 2000). É transmitido de forma não persistente por várias espécies de afídeos, entre eles: *Aphis gossypii* e *Rhopalosiphum maidis*. Pode ser indexado por Elisa ou por RT-PCR. A limpeza clonal para AbaMV não foi relatada até o momento.

Controle de Qualidade Pós-laboratório

Os procedimentos envolvendo a produção *in vitro* de mudas a partir de matrizes indexadas garantem que as mudas produzidas são livres de vírus, mas requerem manejo especial durante as fases de aclimação e estabelecimento inicial da lavoura. A susceptibilidade das mudas à reinfecção durante essas fases não pode ser negligenciada, e requer medidas de controle.

Durante a aclimação

Após a fase de multiplicação *in vitro*, os explantes devem ser retirados dos recipientes em que foram cultivados até então e aclimatados sob condições de luz, temperatura e umidade controladas. A fase de aclimação é uma fase de adaptação em que a plântula proveniente do cultivo *in vitro*, em que as condições do laboratório são próximas do ótimo, deve se adaptar às condições ambientais. Em geral, a muda de banana passa cerca de 45 dias sob um gradiente crescente em luz e temperatura, e decrescente em luz e umidade, até estar pronta para o plantio no campo (SILVA NETO, 2008). Essa fase deve ocorrer em casas de vegetação protegidas contra a entrada de insetos vetores de vírus, pelo uso de tela antiáfídica. As instalações do viveiro devem ser cuidadas com muita atenção para evitar a presença de ervas daninhas

hospedeiras de vírus. Ao final da fase de aclimação, uma amostra significativa das mudas deve ser reindexada a fim de se assegurar que o lote de mudas continua livre de vírus após a aclimação.

Durante o estabelecimento inicial de bananais no Brasil

As mudas jovens, ao serem plantadas no campo, passam por um período inicial de estresse, no qual seu tecido tenro faz com elas se tornem susceptíveis à infecção de vírus a partir da coexistência de vetores e hospedeiros no mesmo ambiente. Por isso, o agricultor deve ter especial cuidado quanto ao controle de ervas daninhas hospedeiras de vírus que acometem a bananeira. No Brasil, especificamente, é comum a presença de trapoeraba (*Commelina* spp.) e plantas da família das cucurbitáceas dentro dos bananais (SILVA NETO, 2003). Essas plantas hospedam o CMV e devem ser controladas. Também, nessa fase, deve-se fazer o controle de afídeos vetores por meio de pulverizações com os inseticidas recomendados, tendo em vista que são importantes vetores de CMV. A presença de plantas cítricas e de cana-de-açúcar nas proximidades ou no interior dos bananais reforça a necessidade de controle do inseto *Planococcus citri*, principal vetor do BSV. A probabilidade de infecção da bananeira jovem é inversamente proporcional ao seu tamanho, idade e teor de lignina nos tecidos. Assim, no Brasil, em locais com histórico de CMV e BSV, e onde ocorre a presença de vetores, é recomendável a utilização de mudas maiores e com maior grau de endurecimento.

Considerações Finais

Embora a utilização de mudas indexadas, produzidas por cultura de tecidos, seja uma das ferramentas mais efetivas para se evitar a disseminação de viroses na bananicultura, muitos dos vírus existentes são de difícil detecção, e requerem infraestrutura laboratorial e know how que nem sempre estão disponíveis em alguns países ou regiões. De acordo com Jones (2002), a possibilidade de que infecções virais não detectáveis na fase de indexação possam ser disseminadas através de mudas micropropagadas é um problema que tem preocupado os serviços de quarentena de vários países, e dificultado o trânsito

internacional de mudas de bananas. Por isso, medidas fitossanitárias adequadas como a indexação de mudas importadas nos portos de entrada e medidas quarentenárias devem ser tomadas para evitar a entrada de mudas contaminadas em regiões livres. É fundamental que os serviços de quarentena vegetal lancem mão de laboratórios de indexação bem equipados e logisticamente disponíveis, bem como a análise de risco junto à região de origem (JONES, 2009). As viroses estão entre os problemas de mais difícil controle que afetam a bananicultura, pois as medidas de convívio com víruses são pouco efetivas e a erradicação acaba sendo a única alternativa. Por causa dessa particularidade, uma das vantagens competitivas da bananicultura no Brasil está na isenção, até o momento, das viroses BBTv, BBrMV, BanMMV, BDBV e AbaMV no território brasileiro. Isso representa uma vantagem competitiva para os produtores de banana brasileiros e deve ser preservada.

Para se alcançar a sustentabilidade na cultura da banana, é muito importante a utilização de mudas de boa qualidade e isentas de vírus. Para isso, a produção de mudas sadias por meio de clonagem *in vitro* via cultura de tecidos a partir de matrizes indexadas é de fundamental importância. É essencial que o processo de indexação seja feito utilizando a metodologia mais indicada para as diversas viroses que afetam a cultura, com especial atenção para a escolha adequada do tecido. O processo de aclimação da muda produzida *in vitro* deve ser feito em instalações adequadas, de forma a evitar a recontaminação da muda por vetores existentes no local. Da mesma forma, o usuário final da muda (agricultor) deve estar bem esclarecido sobre o manejo do bananal nas fases iniciais do estabelecimento da lavoura. Com especial atenção para o controle de ervas daninhas hospedeiras de víruses, controle de insetos vetores, bem como para a não utilização de culturas intercalares com espécies hospedeiras dos vírus que afetam a bananeira. Procedendo dessa forma, garantem-se a produtividade e a qualidade do bananal, estende-se a vida útil do mesmo e alcança-se mais facilmente a autossustentabilidade do bananal.

Referências

- ALVES, E. J.; LIMA, M. B.; SANTOS-SEREJO, J. A.; TRINDADE, A. V. Propagação. In: BORGES, A. L.; SOUZA, L. S. (Ed.). **O cultivo da bananeira**. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2004. p. 59-86.
- BOUHIDA, M.; LOCKHART, B. E. Increase in importance of cucumber mosaic virus infection in greenhouse-grown bananas in Morocco. **Phytopathology**, v. 80, p. 891, 1990.
- CORDEIRO, Z. J. M.; MATOS, A. P.; MEISSNER FILHO, P. E. Doenças e métodos de controle. In: BORGES, A. L.; SOUZA, L. S. (Ed.). **O cultivo da bananeira**. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2004. p. 146-182.
- DALE, J. L. Banana bunch top: an economically important tropical plant virus disease. **Advances in virus research**, v. 33, p. 301-325. 1987.
- DELANOY, M.; SALMON, M.; KUMMERT, J.; FRISON, E.; LEPIBRE, P. Development of realtime PCR for the rapid detection of episomal *Banana streak virus* (BSV). **Plant Disease**, v. 87, p. 33-38, Jan., 2003.
- FAOSTAT Database. Disponível em <<http://faostat.fao.org/site/291/default.aspx>> Acesso em: 31 de jul. 2009.
- FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. Brasília, DF: Embrapa-Cenargen, 1998. 220 p. (Embrapa-Cenargen. Documento, 20).
- FIGUEIREDO, D. V.; BRIOSO, P. S. T. PCR *multiplex* para detecção de BSV e CMV em bananeiras micropropagadas. **Summa phytopathologica**, v. 33, n. 3, p. 229-232, 2007.
- FIGUEIREDO, D. V.; BRIOSO, P. S. T.; MARINHO, V. L. A. Detecção do *Banana streak vírus* (BSV) em bananeiras micropropagadas provenientes de Israel. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 28 (suplemento), p. 371, nov./dez. 2003.
- FRISON, E. A.; SHARROCK, S. L. *Banana streak virus*: a unique virus-*Musa* interaction? In: WORKSHOP OF THE PROMUSA VIROLOGY WORKING GROUP. **Proceedings...** Montpellier, France, 1998. 71 p.
- GRIFFIHS, H. M.; SLACK, S. A.; DODDS, J. H. Effect of chemical and heat therapy on virus concentration in in vitro potato plantlets. **Canadian Journal of Botany**, v. 68, n. 7, p. 1515-1521, jul., 1990.
- HELLIOT, B. Report of the Promusa virology working group meeting. **Promusa**, v. 10, p. 7-10, mar., 2003.

HELLIOT, B.; PANIS, B.; LOCICERO, A.; REYNIERS, K.; MUYLLE, H.; VANDEWALL, C.; MICHEL, C.; SWENNEN, R.; LEPOIVRE, P. Development of in vitro techniques for elimination of virus diseases from *Musa*. In: SORVARI, S. (Ed.) Proceedings of IV International Symposium on In vitro Culture and Horticulture Breeding. **Acta Horticulture**, v. 560, 2001. p. 535-538.

HELLIOT, B.; PANIS, B.; SWENNEN, R.; LEPOIVRE, P.; FRISON, E. Cryopreservation for the elimination of cucumber mosaic virus or banana streak viruses from banana (*Musa* spp.). **Plant Cell Reports**, v. 20, p. 1117-1122. 2002.

HUGHES, J. A.; THOMAS, J. E. Banana die-back. In: Jones, D. R. (Ed.) **Diseases of banana, abaca and enset**. London: CABI Publishing, 2000. p. 278-283.

JONES, D. R. Risk of spread of banana diseases in international trade and germplasm exchange. In: Acorbat. **Memorias XV reunión**. Cartagena de Indias, Colombia, 2002. Medellin: Asociacion de bananeros de Colombia. AUGURA, 2002. p. 105-113.

JONES, D. R. Disease and pest constraints to banana production. In: JONES, D.R.; VAN DEN BERG, I. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON RECENT ADVANCES IN BANANA CROP PROTECTION FOR SUSTAINABLE PRODUCTION AND IMPROVED LIVELIHOODS. Proceedings... White River: ISHS. **Acta Horticulturae**, V. 828, 2009 p. 21-36.

LE PROVOST, G.; ISKRA-CARUANA, M - L.; ACINA, I.; TEYCHENEY, P - Y. Improved detection of episomal *banana streak viruses* by multiplex immunocapture PCR. **Journal of Virological Methods**, v. 137, n. 1, p. 7-13, Oct., 2006.

LOCKHART, B. E. L. Banana streak badnavirus infection in *Musa*: epidemiology, diagnosis and control. Food & Fertilizer Technology Center for Asian and Pacific Region. **Technical Bulletin**, 1995. 11 p.

LOCKHART, B. E. L.; JONES, D. R. Banana mosaic. In: Jones, D. R. (Ed.) **Diseases of banana, abaca and enset**. London, CABI Publishing, 2000. p. 257-263.

MARINHO, V. L. A; BATISTA, M. F. Interceptação, pelo Serviço de Quarentena, de Vírus em Mudas Meristemáticas de Bananeiras Importadas. **Fitopatologia brasileira**. v. 30, n. 5, p. 552, set./out. 2005.

PIETERSEN, G.; THOMAS, J. E. Overview of virus *Musa* diseases. In: HUGHES, J. A.; ODU, B. O. (Ed.). **Plant virology in sub-saharan Africa**. Proceedings of a conference organized by IITA. Abadan, Nigeria: IITA, 2001. p. 50-60.

PLOETZ, R. C.; THOMAS, J. E.; SLABAUG, W. E. Diseases of banana and plantain. In: PLOETZ, R. C. (Ed.) **Diseases of tropical fruit crops**. Orlando, Fl.: CABI Publishing. 2003. p. 73-134.

RAZDAN, M. K. **Introduction to plant tissue culture**. Enfield, NH, USA: Science Publishers Inc., 2003. 375 p.

SILVA NETO, S. P. Micropropagação e controle de víruses. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO SOBRE BANANICULTURA, 1., 2003. Paracatu. **Anais...** Cruz das Almas: Nova Civilizacao, 2003. p. 85-93.

SILVA NETO, S. P. Utilização do cultivo protegido na produção de mudas clonadas in vitro. In: TANIGUCHI, G. T.; FUJIMOTO, F. T. S.; MEDEIROS, W. N.; GROSSI, J.A.S. (Org.). **Cultivo em ambiente protegido**. Viçosa, MG: Agroplan UFV, 2008. p. 169-192.

SUTULA, C. L.; GUILLET, J. M.; MORRISSEY, S. M.; RAMSDELL, D. C. Interpreting ELISA data and establishing the positive-negative threshold. **Plant Disease**, v. 70, n.8, p. 722-726, aug. 1986.

THOMAS, J. E.; ISKRA-CARUANA, M. L. Bunch top. In: Jones, D. R. (Ed.) **Diseases of banana, abaca and enset**. London: CABI Publishing, 2000. p. 241-256.

THOMAS, J. E.; ISKRA-CARUANA, M. L.; MAGNAYE, L.V.; JONES, D. R. Bract mosaic. In: Jones, D. R. (Ed.) **Diseases of banana, abaca and enset**. London: CABI Publishing, 2000. p. 253-257.

THOMAS, J. E.; LOCKHART, B. E. L.; ISKRA-CARUANA, M. L. Banana mild mosaic. In: JONES, D. R. (Ed.) **Diseases of banana, abaca and enset**. London: CABI Publishing, 2000. p. 275-279.

THOMAS, J. E.; MAGNAYE, L. V. Abaca mosaic. In: JONES, D.R. (Ed.) **Diseases of banana, abacá and enset**. 1. Wallingford UK: CAB International, 2000. p. 279-283.

TORRES, A. C.; TEIXEIRA, S. L.; POZZER, L. Cultura de ápices caulinares e recuperação de plantas livres de vírus. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. 1. Brasília: Embrapa-SPI/Embrapa CNPH, 1998. p. 133-160.

UMA, S.; SELVARAJAN, R.; SARASWATHI, M. S.; RAMESH, K. A.; SATHIAMOORTHY, S. Production on quality planting material in banana. In: SINGH, H.P.; DADLANI, N.K. (Ed.) GLOBAL CONFERENCE ON BANANA AND PLANTAIN. **Proceedings...** New Delhi: AIPUB, 2002. p.123-135.

VUYLSTEKE, D. Field performance of banana propagules and somaclones. In: JAIN, S. M.; BRAR, D. S.; AHLOOWALIA, B. S. (Ed.). **Somaclonal variation and induced mutation in crop improvement**. Kluwer Academic, Dordrecht, The Netherlands, 1998. p. 219-231.

Tissue Culture for Control of Banana Viruses in Brazil

Abstract

Among the phytosanitary constraints affecting banana production worldwide, viruses cause heavy losses. To date, seven virus infecting Musa spp. have been reported: AbaMV, BBMV, BBTv, BBrMV, BDBV, BSV and CMV. These viruses can be transmitted in vegetative planting material. Successful control of virus diseases should begin with virus-free planting material produced by tissue culture from virus indexed mother plants. Sensitive and reliable methods of virus detection are available to banana viruses, but they must be used carefully in the banana tissue culture plantlet production system, so that seedlings can be even more reliably certified as virus-free. Two banana viruses are known to be present in Brazil, CMV and BSV. For reliable detection of banana viruses using Elisa and PCR methods, knowledge of the serological diversity of the virus is important. For BBTv and CMV, a few distinctive strains have been reported, while little is known about the serological properties of BBMV, BBrMV, BanMMV, BDBV and BSV. Elisa is used to detect BBTv and CMV, and PCR has been used to detect the other. In case of BSV, PCR based methods of detection must be used carefully because the BSV genetic material is integrated in banana genome. Therefore further studies is needed, but to date the use of Elisa after PCR is advisable, and the IC-PCR method is accepted as the more safe for BSV. After in vitro production, acclimatization of plantlets should be kept protected in an insect-proof, vector-free nursery, and sanitation measures should be enforced. After planting in the field, virus-free plantlets at an early stage of growth should be protected of vectors contact, once they are more vulnerable to virus infection, especially CMV. Measures to repel aphids and control of weeds must be taken. Planting seedlings near vegetable crops known to be hosts of viruses should be avoided.

Index terms: Musa, micropropagation, virus-free plantlets, clonal cleaning, virus management.