

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS**  
**EMBRAPA MANDIOCA E FRUTICULTURA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA**  
**CURSO DE MESTRADO**

**INDEXAÇÃO DE BANANEIRA PARA O *Cucumber mosaic virus* E  
*Banana streak virus***

**NEIDE MOURA DOS SANTOS**

**CRUZ DAS ALMAS – BAHIA**

**JULHO- 2011**

**INDEXAÇÃO DE BANANEIRA PARA O *Cucumber mosaic virus E*  
*Banana streak virus***

**NEIDE MOURA DOS SANTOS**

Bióloga

Universidade Estadual de Feira de Santana, 1999.

Dissertação submetida ao Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia e Embrapa Mandioca e Fruticultura, como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre em Microbiologia Agrícola.

Orientador: Dr. Paulo Ernesto Meissner Filho

**CRUZ DAS ALMAS – BAHIA**

**JULHO- 2011**

## FICHA CATALOGRÁFICA

S237 Santos, Neide Moura dos

Indexação de bananeira para o *cucumber mosaic virus* e banana *streak virus*./ Neide Moura dos Santos.\_ Cruz das Almas - BA, 2011.

83 f.; il.

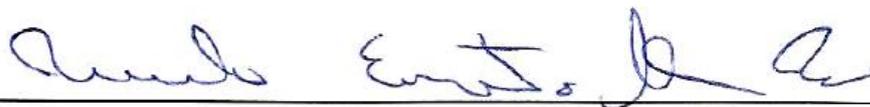
Orientador: Paulo Ernesto Meissner Filho

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia. Centro de Ciências Exatas e Tecnológicas

Ficha catalográfica elaborada pela seção técnica da Biblioteca Central da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Campus Cruz das Almas.

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS**  
**EMBRAPA MANDIOCA E FRUTICULTURA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA**  
**CURSO DE MESTRADO**

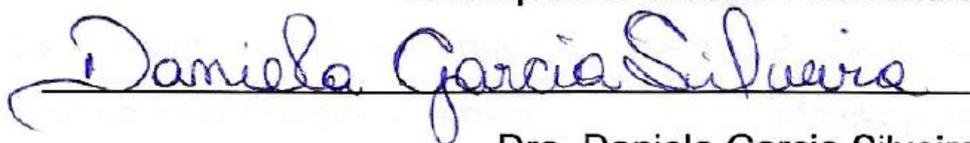
**COMISSÃO EXAMINADORA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE**  
**Neide Moura dos Santos**



**Dr. Paulo Ernesto Meissner Filho**  
**Embrapa Mandioca e Fruticultura**  
**(Orientador)**



**Dr. Eduardo Chumbinho de Andrade**  
**Embrapa Mandioca e Fruticultura**



**Dra. Daniela Garcia Silveira**  
**Universidade Estadual de Feira de Santana**

Dissertação homologada pelo Colegiado do Curso de Mestrado em Microbiologia Agrícola em \_\_\_\_\_ conferindo o grau de Mestre em Microbiologia Agrícola em \_\_\_\_\_

A Deus pela saúde e disposição para superar obstáculos, oferecendo sempre oportunidade de vivenciar momentos tão especiais.

## **AGRADEÇO**

A minha querida mãe **Euridice**, em quem confio e que sempre me anima para buscar meus ideais, por toda força, dedicação e símbolo de luta que representa. A meu pai Aloísio, minha irmã Cleidineia e minha sobrinha Ludmilla pelo amor incondicional, carinho e auxílio para que meus sonhos sempre se tornassem realidade. Minha eterna gratidão!

## **DEDICO E OFEREÇO**

## AGRADECIMENTOS

A **DEUS** por todas as graças e proteção, que em todos os momentos me guiou e me fortaleceu, expressando, de forma simples e grandiosa, seu imenso amor.

A **Dr. Paulo Ernesto Meissner Filho**, meu orientador, amigo e pesquisador da Embrapa Mandioca e Fruticultura por me aceitar como orientada e pelas oportunidades de aprendizado que foram e continuarão a ser de valor inestimável para a continuidade da minha carreira como cientista, pesquisadora e professora. Agradeço muito pelo reconhecimento da minha dedicação ao trabalho e confiança na minha pessoa.

Ao coordenador do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB), **Dr. Jorge Teodoro**, pela imensa capacidade de gerir essa equipe.

A **Emanuel Felipe Medeiros Abreu**, analista da Embrapa Mandioca e Fruticultura por todas as suas contribuições, sugestões e auxílio na resolução de problemas para o bom andamento do trabalho. E agradeço também pelo incentivo para nunca desistir daquilo que acredito e desejo.

A **Epaminondas do Patrocínio**, técnico do laboratório de Biologia Molecular da Embrapa Mandioca e Fruticultura, por toda a atenção, apoio e dedicação dispensados a mim, e pelo exemplo de profissional onde seus ensinamentos contribuíram para o aprimoramento e realização deste trabalho.

A **Dr. Nilton Fritz Sanches**, pesquisador da Embrapa Mandioca e Fruticultura, pelo fornecimento das cochonilhas para realização de teste biológico.

A **Dr. Rômulo da Silva Carvalho**, por ter aberto as portas do Laboratório de Entomologia da Embrapa Mandioca e Fruticultura para que eu pudesse atuar como estagiária, confiando na minha competência mesmo sem termos trabalhado anteriormente.

Aos colegas e amigos do **Laboratório de Virologia e Biologia Molecular** da Embrapa Mandioca e Fruticultura especialmente a Raimundo, Dr. Eduardo, Karina, Keila, Alessandra, Cleidiane e Adriana pela convivência, incentivo e colaboração nos trabalhos de pesquisa e a todos os **funcionários** da Embrapa Mandioca e Fruticultura.

Aos **membros da banca de avaliação**, Dr. Eduardo Chumbinho de Andrade e Dra. Daniela Garcia Silveira, pelas correções e comentários. Essa colaboração foi importantíssima, melhorando a qualidade e valorizando o trabalho final.

Aos meus **familiares**, pessoas mais que especiais em minha vida, agradeço por todo amor e dedicação; à minha querida sobrinha Ludmilla e minha afilhada Fernanda pela alegria, inspiração, leveza, ou seja, tudo que uma criança pode transmitir nesse momento. A minha avó Domingas Souza dos Santos (in memoriam) e meu avô José Gonçalves Moura (in memoriam), que mesmo não estando presentes fisicamente, estiveram em meus pensamentos em todos os momentos.

À minha amiga e comadre, **Jacqueline Leite Dias Estevam**, pelo carinho, auxílio em todos os momentos, palavras de incentivo, momentos de descontração e amizade incomparável.

Agradeço a todos os **amigos**, especialmente a Luciana, Luciene, Evani, Thaianne, Patrícia e Adailson, pelo carinho e amizade, por suportar durante o período do mestrado a minha ausência e muitas vezes o mau humor.

A Universidade Federal do Recôncavo da Bahia – **UFRB** – Campus de Cruz das Almas no nome dos professores do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola pelos ensinamentos acadêmicos e aos funcionários da Secretária de Pós-Graduação e da Biblioteca pela atenção despendida nos últimos três anos.

A **Embrapa** Mandioca e Fruticultura, pela disponibilização do material biológico objeto desse estudo, bem como de suas instalações que permitiram o desenvolvimento deste trabalho.

**A todos, meus sinceros agradecimentos.**

Quando deixamos de contribuir  
começamos a morrer.

Eleonor Roosevelt

# ÍNDICE

Página

RESUMO

ABSTRACT

INTRODUÇÃO ..... 01

## CAPÍTULO 1

A cultura da bananeira e suas viroses .....	04
1.1 Gênero <i>Musa</i> .....	07
1.2 História e evolução .....	08
1.3 Aspectos sócio-econômicos .....	09
1.4 Morfologia .....	12
1.5 Características das cultivares em estudo .....	14
1.6 Viroses e a indexação de plantas .....	19
1.6.1 <i>Cucumber mosaic virus</i> .....	20
1.6.2 <i>Banana streak virus</i> .....	24
1.6.2.1 A cochonilha vetora <i>Planococcus citri</i> .....	28
1.6.3 Métodos de indexação para viroses.....	29
1.6.3.1 Leitura de sintomas .....	30
1.6.3.2 Método biológico .....	30
1.6.3.3 Método sorológico.....	31
1.6.3.4 Método molecular .....	32

## **CAPÍTULO 2**

Indexação de bananeira para o <i>Cucumber mosaic virus</i> e <i>Banana streak virus</i> .....	33
2.1 Introdução.....	37
2.2 Material e Métodos.....	39
2.3 Resultados e Discussão .....	56
2.4 Conclusões .....	68
<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	69
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	70

## RESUMO

### **Santos, N. M. Indexação de bananeira para o *Cucumber mosaic virus* e *Banana streak virus***

A bananeira (*Musa spp.*) é cultivada na maioria dos países tropicais e subtropicais. No entanto, durante sua produção pode ser afetada por condições ambientais adversas, pragas e doenças de acordo com a variedade plantada. 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 desta espécie. A dificuldade de detecção, identificação e posterior erradicação das viroses, tornam o princípio da prevenção da doença, através da exclusão, extremamente importante. Dentre as viroses que já foram relatadas em bananeiras mundialmente, apenas o *Cucumber mosaic virus* e *Banana streak virus* ocorrem no Brasil. O objetivo deste trabalho foi indexar o matrizeiro de bananeira, localizado no campo experimental da Embrapa Mandioca e Fruticultura, para o CMV e BSV, bem como avaliar a eficiência de alguns métodos em uso na Embrapa para esta finalidade. Para isto foram utilizadas as seguintes técnicas: sintomatologia apresentada, indexação biológica, DAS-ELISA, RT-PCR e PCR. Nenhuma das matrizes apresentaram sintomas semelhantes aos causados pelo CMV. A indexação para o CMV por DAS-ELISA permitiu confirmar a ausência deste vírus nas amostras analisadas. Ajustou-se um protocolo para a extração de RNA total de qualidade de bananeira. As reações de RT-PCR para o CMV foram ajustadas. No levantamento visual detectou-se quatro matrizes com sintomas semelhantes aos causados pelo BSV. A indexação utilizando teste biológico para o BSV indicou a presença de cinco matrizes infectadas. Avaliou-se nove combinações de *primers* degenerados para o BSV, sendo que, apenas três amplificaram fragmentos específicos e nos tamanhos esperados. Os resultados obtidos permitiram uma avaliação dos métodos de indexação para CMV e BSV usados pela Embrapa Mandioca e Fruticultura em bananeira.

**Palavras-chave:** *Musa spp.*, detecção, CMV, BSV.

## **ABSTRACT**

### **Santos, N. M. Indexing banana to *Cucumber mosaic virus* and *Banana streak virus***

The banana (*Musa* spp.) is cultivated in most tropical and subtropical countries. However, during its production can be affected by adverse environmental conditions, pests and diseases, according to the variety planted. Viruses are among the main problems that limit plant banana production in various regions of the world, ultimately becoming the main obstacle to the free international movement of germplasm of this species. The difficulty of detection, identification and eradication of viruses, make the principle of prevention of disease through the exclusion extremely important. Among the viruses that have been reported only in worldwide banana *Cucumber mosaic virus* and *Banana streak virus* occurring in Brazil. The objective of this study was to index the banana matrices, located in the experimental field of Embrapa Cassava and Fruits, CMV and BSV, and assess the efficiency of some methods in use for this purpose at Embrapa. For this we used the following techniques: symptomatology presented, biological indexing, the DAS-ELISA, PCR and RT-PCR. None of the matrices showed symptoms similar to those caused by CMV. Indexing for CMV by DAS-ELISA confirmed the absence of virus in the samples analyzed. It set a protocol for the extraction of quality total RNA from banana. The reactions of RT-PCR for CMV were adjusted. In the visual survey detected five plants arrays with symptoms similar to those caused by BSV. We evaluated nine combinations of degenerate primers for BSV, and that only three amplified specific fragments with expected sizes. The results allowed an evaluation of methods for CMV and BSV indexing used by Embrapa Cassava and Fruits in banana.

**Keywords:** *Musa* spp., detection, CMV, BSV.

# INTRODUÇÃO

A maioria das cultivares de bananeira (*Musa* spp.) originou-se do Sudoeste Asiático, ainda que haja outros centros de origem secundários, como África Oriental e ilhas do Pacífico, além de um importante centro de diversidade na África Ocidental (CASTRO et al., 2008).

A banana é uma das frutas mais importantes do mundo, tanto no que se refere à produção quanto à comercialização. Para muitos países, além de ser um alimento complementar da dieta da população, apresenta grande relevância social e econômica, servindo como fonte de renda para muitas famílias de agricultores, gerando postos de trabalho, no campo e na cidade, e contribuindo para o desenvolvimento das regiões envolvidas em sua produção. Em muitos países, a banana é um importante produto de exportação (FIORAVANÇO, 2003), já no Brasil a maior parte de sua produção é destinada ao mercado interno.

Segundo a FAO (*Food and Agriculture Organization*) em 2008 o Brasil ocupou o quarto lugar na produção mundial de banana, com 8% do volume total produzido, numa área de 6.998.150 hectares. Neste mesmo ano a Índia foi o maior produtor seguido pelas Filipinas e China. Já no ano de 2009 o Brasil produziu 7.193.189 toneladas de banana, o que significa um aumento médio de 3% na sua produção em relação ao ano anterior.

A bananeira está entre as culturas de maior importância econômica para os países tropicais e subtropicais. Pertence à família das Musáceas, é cultivada em todos os estados brasileiros principalmente em São Paulo, Bahia, Santa Catarina, Minas Gerais e Pará (Tabela 1). Entretanto, certos fatores climáticos, como a temperatura e o regime de chuvas, impõem limites à cultura, favorecendo, por isso, sua concentração em alguns estados brasileiros (BORGES et al., 2006).

De acordo com o levantamento estatístico da produção agrícola do Brasil feito pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), em 2010 a área plantada com bananeira foi de 521.853 hectares. A bananeira diferencia-se das demais espécies de plantas frutíferas, pois apresenta um fluxo contínuo de produção a partir do primeiro ano de cultivo, atraindo os

produtores, que obtêm o retorno do capital investido rapidamente (BOAS et al., 2002).

Tabela 1. Principais Estados produtores de banana no Brasil em 2010.

Estados	Produção em toneladas
São Paulo	1.271.500
Bahia	1.079.050
Santa Catarina	672.892
Minas Gerais	654.444
Pará	514.922
Outros	2.810.876

Fonte: IBGE- Consultado em 22/06/2011.

Entre os maiores problemas do cultivo de banana no Brasil, está a falta de cultivares, com porte adequado e resistência às principais pragas e doenças, e o manejo inadequado do sistema solo-água-planta. A bananeira é atacada por fungos, vírus, bactérias e nematóides, ocasionando uma série de doenças que prejudicam substancialmente a produtividade. As principais doenças que acometem as bananeiras são: o mal-do-Panamá, cujo agente causal é o *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*, a Sigatoka-amarela, causada por *Mycosphaerella musicola*, o Moko ou murcha bacteriana da bananeira causada por *R. solanacearum*, e Sigatoka-negra, causada por *Mycosphaerella fijiensis* (CORDEIRO et al., 2005).

Todavia as viroses merecem atenção especial, uma vez que os vírus podem ser transmitidos por insetos vetores e pelas mudas, que são propagadas de forma vegetativa, o que representa uma ameaça à produção, tanto nas áreas onde um vírus é endêmico, quanto naquelas livres de vírus, mas que recebem mudas provenientes de diferentes regiões (SHARMAN et al., 2000).

O vírus do mosaico do pepino (*Cucumber mosaic virus*, CMV) apresenta uma distribuição mundial. O CMV pertence ao gênero *Cucumovirus*, família *Bromoviridae*. É transmitido de forma não-circulativa por mais de 60 espécies de afídeos, sendo importantes para a bananeira as espécies *Aphis gossypii*, *A. craccivora*, *Myzus persicae* (RAMIREZ & RIVERA, 1994; NIBLLETT et al., 1994), *Rhopalosiphum* spp. (LOCKHART & JONES, 2000) e por inoculação mecânica. Os sintomas do CMV em bananeira variam de ligeiras estrias amarelas sobre folhas velhas, até severa necrose interna do pseudocaule,

nanismo e morte das plantas (BELALCAZAR CARVAJAL, 1991; NIBLETT et al., 1994).

O vírus das estrias-das-bananeiras (*Banana streak virus*, BSV) já está presente em bananais da Ásia, Austrália e América Latina. No Brasil sua ocorrência foi descrita pela primeira vez em associação com o CMV (BRIOSO et al., 2000). O BSV pertence ao gênero *Badnavirus*, estando atualmente classificado na família *Caulimoviridae*. É disseminado na natureza de forma não circulativa pelas cochonilhas *Planococcus citri* e *Saccharicoccus sacchari* (Hemiptera: Pseudococcidae) (VAN REGENMORTEL, 2000). As bananeiras infectadas com o BSV podem apresentar sintomas de riscas foliares, lesões foliares cloróticas, mosaico, má formação dos frutos e diminuição do cacho (MEISSNER FILHO et al., 2000).

Este trabalho visou indexar o matrizeiro de bananeira, localizado no campo experimental da Embrapa Mandioca e Fruticultura, para o *Cucumber mosaic virus* e *Banana streak virus*, bem como avaliar a eficiência de alguns métodos diagnósticos em uso na Embrapa para esta finalidade.

---

# **CAPÍTULO 1**

**A cultura da bananeira e suas viroses**

---

## RESUMO

### **Santos, N. M. A cultura da bananeira e suas viroses**

Foi realizada uma revisão de literatura sobre a cultura da bananeira e seus problemas fitossanitários. A seguir enfocou-se as principais viroses já identificadas mundialmente e as detectadas no Brasil. Inicialmente foram descritas as principais características do gênero *Musa*, bem como sua história e evolução, aspectos sócio-econômicos e morfologia inerentes a cultura da bananeira. Então descreveu-se as principais características das variedades de bananeiras que estavam presentes no matrizeiro. As viroses causadas pelo *Cucumber mosaic virus* (CMV) e *Banana streak virus* (BSV) foram detalhadas, no que se refere as características do seu genoma, etiologia da doença, formas de transmissão, culturas hospedeiras e sua distribuição no território brasileiro. Além disso, foram descritos os métodos mais utilizados de indexação para viroses, justificando a necessidade de realização de trabalhos nessa direção.

**Palavras-chave:** Cucumovirus, clorose infecciosa, Badnavirus, estrias-da-bananeira.

## ABSTRACT

### **Santos, N. M. The banana plantations and their viruses**

A review of literature on the culture of the banana plant and its problems. The following are the main focused on already identified viruses detected worldwide and in Brazil. Initially, we described the main characteristics of the genus *Musa*, as well as its history and evolution, socio-economic and morphology inherent in banana plantations. And then described the main characteristics of banana varieties that were present in greenhouse. Virus diseases caused by *Cucumber mosaic virus* (CMV) and *Banana streak virus* (BSV) were detailed, as regards the characteristics of your genome, disease etiology, modes of transmission, distribution and host crops in Brazil. In addition, we describe the most used methods of indexing for viruses, justifying the need for undertaking work in this direction.

**Keywords:** *Cucumovirus*, infectious chlorosis, *Badnavirus*, stretch-the-banana.

# 1. REVISÃO DE LITERATURA

## 1.1 GÊNERO MUSA

Bananeira é a denominação genérica para diversas espécies pertencentes ao gênero *Musa*, dentro da família *Musaceae*. A grande maioria das plantas cultivadas para fins alimentares integra a seção Eumusa (SEBRAE, 2008). As cultivares encontradas atualmente são um resultado do cruzamento das espécies diplóides selvagens *Musa acuminata* e *Musa balbisiana* e posterior seleção.

As bananeiras produtoras de frutos comestíveis são plantas da classe das Monocotiledôneas, ordem *Scitaminales*, família *Musaceae*, onde se encontram as subfamílias *Heliconioideae*, *Strelitzioideae* e *Musoideae*. Esta última inclui, além do gênero *Ensete*, o gênero *Musa*, constituído por quatro séries ou seções: *Australimusa*, *Callimusa*, *Rhodochlamys* e (Eu-) *Musa* (SIMMONDS, 1973).

Dentro do gênero *Musa* existem no mínimo duas espécies, *M. ingens* ( $2n=14$ ) e *M. beccarii* ( $2n=18$ ), que não são classificáveis nestas seções. A separação entre (Eu-) *Musa* e *Rhodochlamys* é artificial e não reflete bem os graus de isolamento reprodutivo (SHEPHERD, 1990). A seção (Eu-) *Musa* é a mais importante, pois, além de ser formada pelo maior número de espécies do gênero, apresenta ampla distribuição geográfica e abrange as espécies de bananas comestíveis (ALVES, 1999).

A classificação proposta por Cheesman (1948) citado por DANTAS & SOARES FILHO (2000) para o gênero *Musa*, aceita atualmente em todo o mundo, baseia-se no número básico de cromossomos dividindo as espécies em dois grupos: as espécies com  $n = 10$  cromossomos; e as com  $n = 11$  cromossomos que integram as seções *Rhodochlamys* e (EU-) *Musa*, respectivamente. Atualmente a maioria das variedades de importância econômica são híbridos resultantes de cruzamentos de *M. acuminata* e *M. balbisiana*.

## 1.2 HISTÓRIA E EVOLUÇÃO

Não se pode indicar com exatidão a origem da bananeira, pois ela se perde na mitologia grega e indiana. Admite-se que ela seja originária do Oriente, sul da China ou Indochina. Há referências da sua presença na Índia, Malásia ou Filipinas, onde tem sido cultivada há mais de 4.000 anos (MOREIRA, 1987).

A África Ocidental recebeu suas primeiras mudas cultivadas há mais de três mil anos, apesar de ainda não haver consenso com relação aos responsáveis por este transporte. Na Europa, permaneceu razoavelmente desconhecida até o século X. Relatos sobre a fruta na literatura greco-romana são esparsos. As navegações portuguesas e espanholas no século XV foram as responsáveis pela rápida disseminação da bananeira na América, onde encontrou condições climáticas notáveis para seu desenvolvimento (ALVES, 1999).

No Brasil, o cultivo se espalhou rapidamente por entre as comunidades indígenas. Em pouco tempo, passou a ser parte integrante de um número significativo de pratos tradicionais. Também se mostrou excelente matéria-prima para a produção de artefatos de uso diário, como cestos e balaios. Os métodos de preparo do material foram gradualmente desenvolvidos e passados de geração em geração, sendo utilizados até hoje na elaboração de peças de artesanato (ALVES, 1999).

Na evolução das bananeiras comestíveis participaram principalmente as espécies diplóides selvagens *M. acuminata* e *M. balbisiana*, de modo que cada cultivar pode conter combinações variadas de genoma completo dessas espécies. Esses genomas são denominados pelas letras A (*M. acuminata*) e B (*M. balbisiana*), cujas combinações resultam grupos diplóides (AA, BB e AB), triplóides (AAA, AAB e ABB) e tetraplóides (AAAA, AAAB, AABB, ABBB) (ALVES, 1999) (Figura 1).

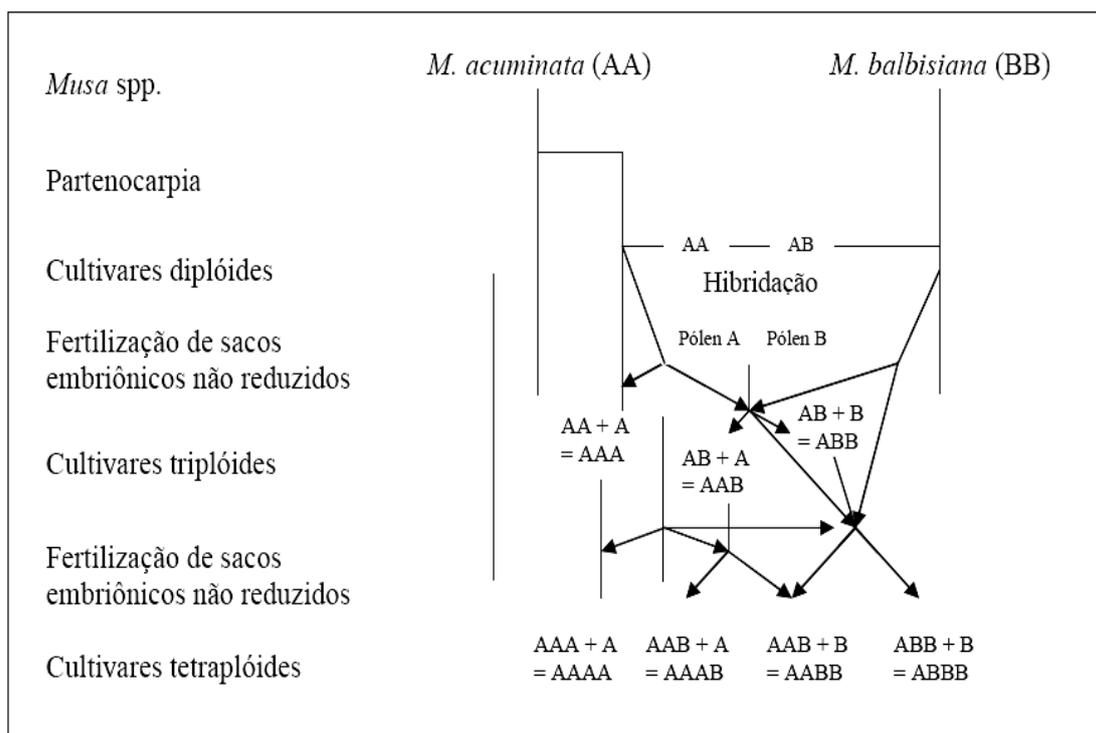


Figura 1. Evolução das cultivares de bananas comestíveis (ALVES, 1999).

Apesar de não ser nativa do Brasil, o cultivo da bananeira no país se espalhou de tal maneira que hoje se destaca como a fruta mais consumida pelos brasileiros. Assume importância essencialmente como alimento de consumo interno, onde participa da dieta alimentar de todas as classes sociais e faixas de idade, sendo consumida, em especial, sob a forma *in natura*, ou na forma de doces e passas, além de assada, frita e cozida.

### 1.3 ASPECTOS SÓCIO-ECONÔMICOS

No Brasil, além dos genótipos do subgrupo *Cavendish*, diversas variedades regionais são consideradas de interesse comercial, levando-se em conta a preferência do consumidor. Nas últimas décadas, tem sido crescente a ampliação da área plantada com a bananeira cultivar Pacovan (*Musa* sp. AAB, subgrupo Prata), a qual ocupa uma expressiva fatia do mercado Nordestino, parte desta antes ocupada pela bananeira 'Prata' (*Musa* sp. AAB), variedade semelhante, mas menos produtiva que cultivar Pacovan (NOBREGA, 2006).

Segundo Manica (1998) a banana tem um grande aproveitamento, pois o fruto ainda verde é utilizado para fazer farinha de banana, tortas forrageiras

ou consumido depois de cozidos. Na indústria, a banana é utilizada para o preparo de purê de banana acidificado, néctar de banana, banana-passa, banana aromatizada, banana cristalizada, banana em calda, bananada ou doce de massa de banana, essências, vinho, vinagre, geléia e aguardente. A banana é fruta de alto valor nutritivo, muito rica em açúcar e sais minerais, principalmente cálcio, fósforo e ferro, e vitaminas A, B1, B2 e C. Fácil de digerir pode ser dada às crianças a partir dos seis meses de idade. Como quase não tem gordura, é indicada nas dietas baixas em colesterol. Pode ser consumida ao natural, como sobremesa, ou ser usada nos mais variados tipos de prato: salada de frutas, bolos, tortas, vitaminas, sorvetes, mingaus, recheios de aves e carnes, farofas, musses e sanduíches.

Embora seja uma das principais frutas brasileiras exportadas, a banana está longe de liderar as exportações para os países mais desenvolvidos, que possuem os mercados mais exigentes do mundo. O produto nacional, de modo geral, não atende as exigências dos mercados europeus e norte-americanos, principalmente em relação às qualidades organolépticas da banana. A ocorrência de escurecimento da casca da banana, em função das baixas temperaturas nos estados do Sudeste e Sul, limita a produção de banana nestas regiões, onde se encontra maior tecnologia na produção de banana (MATTHIESEN & BOTEON, ano não publicado).

Para exportação as áreas potenciais para a produção estão nos vales dos grandes rios do Nordeste, pois além do clima ideal, apesar dos ventos fortes, a maior proximidade dos mercados importadores é um fator decisivo. Entretanto, a região ainda não possui tecnologias de produção, pós-colheita, comercialização e transporte ideais para o mercado internacional de banana. Uma exceção é a região do Vale do Rio Açu no Rio Grande do Norte, onde se encontra um pólo produção de banana de altíssima qualidade para esses mercados, comandado pela multinacional Del Monte (MATTHIESEN & BOTEON, ano não publicado).

Embora exista um número expressivo de cultivares de banana no Brasil, quando se considera aspectos como preferência dos consumidores, produtividade, tolerância a pragas e doenças, resistência à seca, porte e resistência ao frio, restam poucas com potencial para serem usadas comercialmente. Os cultivares mais difundidos no Brasil são: Prata, Pacovan,

Prata Anã, Maçã, Mysore, Terra e d'Angola, do grupo AAB, e Nanica, Nanicão e Grande Naine, do grupo AAA, utilizados principalmente na exportação. Os cultivares Prata e Pacovan são responsáveis por aproximadamente 60% da área cultivada do Brasil (ALVES, 1999).

No Brasil, segundo ao GCEA/IBGE (2010) a região Nordeste ocupou o primeiro lugar na produção, seguidos pela região Sudeste e Sul (Tabela 2). Estas últimas regiões possuem maior nível tecnológico e produtores mais organizados, além de estarem mais próximas dos países do extremo sul da América, desta forma podem torna-se exportadores. Nessas regiões, as variedades tipo Cavendish (Nanica e Nanicão) são as mais predominantes, seguidas da cultivar Prata (CORDEIRO, 2000).

Tabela 2. Produção brasileira de banana por região fisiográfica em 2010

Região	Produção em toneladas
Norte	781.310
Nordeste	2.671.374
Sudeste	2.261.470
Sul	1.031.666
Centro-oeste	257.864
Total	7.003.684

Fonte: IBGE - Consultado em 22/06/2011.

Dado o seu enorme potencial, a bananicultura é motivo de interesse cada vez maior da parte dos pesquisadores e produtores do mundo inteiro. O uso da propagação vegetativa a partir de mudas provenientes de brotos laterais de plantas adultas gera um baixo número e desuniformidade na produção de mudas para plantios de grandes áreas, podendo também constituir um mecanismo de disseminação de pragas e doenças como o mal-do-Panamá, broca, nematóides, vírus, moko e podridão mole. Atualmente a produção em larga escala de mudas de bananeira tem sido realizada em laboratório utilizando a técnica de micropropagação a partir de ápices caulinares e/ou gemas lateral, onde é possível multiplicar cultivares promissores, bem como a conservação *in vitro* e intercâmbio de germoplasma (SANTOS-SEREJO et al., 2009).

Ocorreram muitos avanços no conhecimento sobre a diversidade de viroses da bananeira, sobre a sua biologia molecular, assim como o

desenvolvimento de métodos para sua detecção, especialmente na última década. O número de viroses relatadas em bananeiras aumentou de cinco em 1996 (DIEKMANN & PUTTER, 1996) a pelo menos 12 em 2007 (Tabela 3) (GEERING, 2009).

Tabela 3. Espécies de vírus que já foram relatadas em bananeira

Espécies	Gênero	Família	Abreviatura	Referências
<i>Abacá bunchy top virus</i>	<i>Badnavirus</i>	<i>Nanoviridae</i>	ABTV	Sharman et al. (2008)
<i>Banana bunchy top virus</i>	<i>Badnavirus</i>	<i>Nanoviridae</i>	BBTV	Burns et al. (1995)
<i>Banana bract mosaic virus</i>	<i>Potyvirus</i>	<i>Potyviridae</i>	BBrMV	Bateson & Dale (1995)
<i>Banana mild mosaic virus</i>	Não identificado	<i>Flexiviridae</i>	BanMMV	Gambley & Thomas (2001)
<i>Banana streak Cavendish virus</i>	<i>Badnavirus</i>	<i>Caulimoviridae</i>	BSV-Cav	Geering et al. (2000)
<i>Banana streak GF virus</i>	<i>Badnavirus</i>	<i>Caulimoviridae</i>	BSGFV	Geering et al. (2000)
<i>Banana streak OL virus</i>	<i>Badnavirus</i>	<i>Caulimoviridae</i>	BSOLV	Harper & Hu (1998)
<i>Banana streak Mysore virus</i>	<i>Badnavirus</i>	<i>Caulimoviridae</i>	BSMyV	Geering et al. (2005b)
<i>Banana streak Vietnam virus</i>	<i>Badnavirus</i>	<i>Caulimoviridae</i>	BSV-VN	Lheureux et al. (2007)
<i>Banana virus X</i>	Não identificado	<i>Flexiviridae</i>	BVX	Teycheney et al. (2005)
<i>Cucumber mosaic virus</i>	<i>Cucumovirus</i>	<i>Bromoviridae</i>	CMV	Lockhart & Jones (2000)
<i>Sugarcane mosaic virus</i>	<i>Potyvirus</i>	<i>Potyviridae</i>	SCMV	Gambley et al. (2004)

Fonte: Geering (2009).

#### 1.4 MORFOLOGIA

A bananeira é uma planta herbácea, caracterizada pela exuberância de suas formas e dimensões das folhas. Possui tronco curto e subterrâneo, denominado de rizoma, que constitui um órgão de reserva, onde se inserem as raízes adventícias e fibrosas. O pseudocaule, resultante da união das bainhas foliares termina com uma copa de folhas longas e largas, com nervura central desenvolvida. Do centro da copa emerge a inflorescência com bráctea de coloração normalmente roxo-avermelhada, em cujas axilas nascem as flores. Cada grupo de flores reunidas forma uma penca (mão) com um número

variável de frutos (dedos), originados por partenocarpia (Figura 2) (DANTAS et al., 1999).

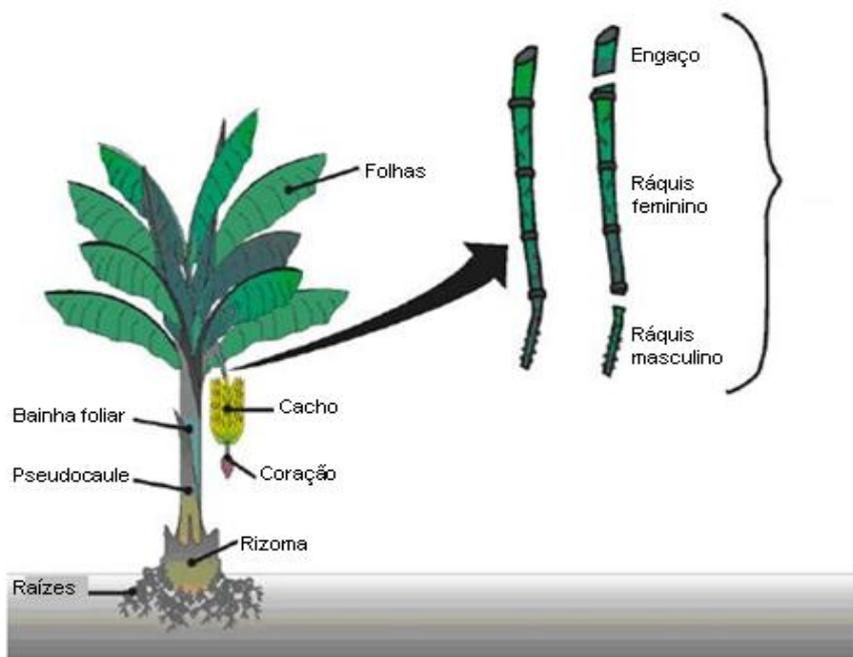


Figura 2. Estrutura e partes da bananeira (SOFFNER, 2001).

Os frutos inicialmente são verdes, tonando-se amarelos com a maturação, posteriormente começam a escurecer e nesse estágio diz-se que a planta morreu. Entretanto, durante o desenvolvimento há formação de rebentos (filhos), que surgem na base da planta, possibilitando a constante renovação e a vida permanente dos bananais (DANTAS et al. 1999).

As raízes da bananeira são inicialmente fasciculadas, brancas e tenras, e a medida que envelhecem vão se tornando amareladas e endurecidas, apresentando-se suberosas quando maduras. De comprimento variável, podem atingir de 5 a 10 m, dependendo do genótipo e das condições edáficas. Em geral, 70% das raízes são encontradas a uma profundidade de até 20 cm. O rizoma é definido morfológicamente como um caule horizontal que desenvolve folhas na parte superior e raízes adventícias na parte inferior. Um rizoma é constituído de duas zonas: o córtex que desempenha um papel de proteção, e o cilindro central, de onde o sistema radicular e a parte aérea originam-se. Cortando um rizoma longitudinalmente, observa-se a gema apical de

crescimento localizada no centro de uma região de formato cônico, denominada colo da bananeira (LIMA et al., 2003).

O pseudocaule, estrutura constituída pelas bainhas das folhas da bananeira, corresponde ao que é normalmente denominado caule ou tronco da bananeira. A folha da bananeira constitui-se de bainha foliar, pseudopecíolo, nervura central e limbo foliar. As bainhas das folhas da bananeira se fixam no rizoma de forma concêntrica, gerando arcos cujas extremidades não se tocam e determinando o aparecimento de um ponto em que se observa um pequeno conjunto de células denominado gema lateral de brotação. A gema apical sofre sucessivas bipartições, dando origem a uma folha com gema lateral de brotação. A bananeira, assim, apresenta tantas gemas laterais quantas forem as folhas geradas. A produção de folhas de uma bananeira compreende o período que se estende do plantio ao florescimento, momento a partir do qual o processo cessa. As partes do cacho são o pedúnculo (engaço), a raque, a inflorescência feminina, a inflorescência hermafrodita e a inflorescência masculina (LIMA et al., 2003).

Os frutos da bananeira se originam das flores localizadas na inflorescência feminina. Existe uma grande variação no tamanho, número e formato dos frutos que dependem da cultivar e das condições de vegetação da planta. Os frutos podem ser eretos a curvos, atingirem comprimento de até 50 cm e diâmetro até próximo a 10 cm. A casca apresenta coloração que vai do creme-palha a quase preta, passando por verde-clara, amarela e avermelhada (MOREIRA, 1987). O coração da bananeira é a estrutura que compreende a inflorescência masculina (LIMA et al., 2003).

## **1.5 CARACTERÍSTICAS DAS CULTIVARES A SEREM INDEXADAS**

O programa de melhoramento genético da Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, em parceria ou não com outras instituições, tem nos últimos anos, recomendado cultivares que possam atender as exigências do mercado consumidor, as condições ambientais em que serão cultivadas, bem como o destino da produção (indústria ou consumo *in natura*). A seguir são apresentadas características de cultivares de grande interesse comercial que

foram selecionadas pelo CNPMF e serão indexadas para o *Cucumber mosaic virus* e *Banana streak virus*.

A cultivar Caipira é uma variedade triplóide com genoma AAA, cujo nome original é Yangambi Km 5, oriunda da África Ocidental, introduzida no Brasil pela Embrapa Mandioca e Fruticultura. Ela é uma planta rústica, com pseudocaule verde-amarelo-pálido, com manchas escuras próximas à roseta foliar. As folhas são eretas e estreitas, com margens dos pecíolos avermelhados. O cacho é cilíndrico. A ráquis masculina é desprovida de brácteas. Os frutos são curtos e grossos, possui sabor levemente adocicado, podendo ser consumida in natura ou processada artesanal e industrialmente na forma de farinha e doces. Suas principais características agrônômicas são adequadas para o estado do Amazonas. É uma cultivar conhecida internacionalmente pelas suas características de resistência aos principais problemas fitossanitários da cultura (GASPAROTTO et al., 1999). Segundo Oliveira & Silva et al. (2008) esta cultivar destaca-se pelo vigor vegetativo, sendo resistente à Sigatoka-negra, Sigatoka-amarela e ao mal-do-Panamá.

A Nam (Prata Baby) é uma cultivar triplóide com genoma AAA de porte médio a alto, introduzida da Tailândia, resistente à Sigatoka-amarela e ao mal-do-Panamá. Depois de avaliada em diversos locais, foi recomendada em Santa Catarina com o nome de Prata Baby. No mercado seus frutos atingem preço superior ao da Prata-Anã (OLIVEIRA & SILVA et al., 2008).

A cultivar Grande Naine, pertencente ao grupo genômico AAA, é uma variedade tipo Cavendish, mutante de Nanica, de alta produtividade, suscetível às sigatokas amarela e negra e resistente ao mal-do-Panamá. É a cultivar mais usada na Martinica. Apresenta altura que varia entre 2,0 e 3,0 m. Comparada a cultivar Nanica possui roseta foliar não tão compacta. Mas de cor idêntica à do pseudocaule, pecíolo e limbo. A parte superior da planta (bainha e pecíolo) é marcadamente cerosa. A cor do pecíolo e da nervura central varia entre verde-claro e amarelo-pálido-esverdeado (DONATO et al., 2006).

A cultivar Thap Maeo é um triplóide de genoma AAB, que apresenta porte alto, alta rusticidade, resistência às sigatokas negra e amarela e ao mal-do-Panamá. Sob condições de solo de boa fertilidade, apresenta produtividade média de até 35 t/ha<sup>-1</sup> (OLIVEIRA & SILVA et al., 2008). Em solos de baixa fertilidade na região amazônica, tem apresentado um bom grau de rusticidade e

produtividade na faixa de 25 t/ha<sup>-1</sup>. É uma variante da Mysore, selecionada na Embrapa Mandioca e Fruticultura, Cruz das Almas - BA, cujas plantas encontram-se livres do vírus das estrias da bananeira (BSV), apresenta pseudocaule menos manchado, mais vigor e cachos maiores (GASPAROTTO et al., 1999).

A Pacovan é resultante de uma mutação da Prata, pertencente ao grupo AAB e é mais produtiva e vigorosa do que esta cultivar. Tem porte alto, superior ao da Prata. O pseudocaule é verde claro, com poucas manchas escuras. O cacho é pouco cônico, coração médio e frutos grandes, com quinas proeminentes mesmo quando maduros, ápices em forma de gargalo e sabor azedo-doce, mais ácido do que a prata. A cultivar é suscetível às Sigatocas amarela e negra e ao mal-do-Panamá, todavia apresenta boa tolerância à broca-do-rizoma e aos nematóides. Também tem boa aceitação pelos consumidores (<http://minhasfrutas.blogspot.com>. Acesso em: 23 mar. 2011). Segundo Silva et al. (1999) apresenta um bom potencial de produtividade sob irrigação, podendo atingir 35/40 t/ha/ciclo em cultivos bem conduzidos. Apresenta também bom vigor, não sendo necessário o escoramento.

Prata Anã é uma cultivar do grupo AAB, variedade tipo Prata, identificada em Criciúma, Santa Catarina, ocupa a maior área cultivada entre as regiões sudoeste da Bahia e Norte de Minas Gerais, com frutos bem aceitos no mercado interno, porte baixo a médio e baixa produtividade (DONATO et al., 2008). A Prata Anã também é conhecida como Prata-rio, Enxerto ou Prata-de-Santa-Catarina. Possui pseudocaule muito vigoroso de cor verde-clara, brilhante, com poucas manchas escuras próximo à roseta foliar. O porte é médio a alto, cacho cônico, ráquis com brácteas persistentes, coração grande e frutos pequenos, com quinas, ápices em forma de gargalo e sabor acre-doce (azedo-doce). A cultivar é suscetível às sigatocas amarela e negra e ao mal-do-Panamá, todavia apresenta boa tolerância à broca-do-rizoma e aos nematóides (<http://minhasfrutas.blogspot.com>. Acesso em: 23 mar. 2011). Apresentam frutos que atendem a preferência do mercado brasileiro, sendo umas das cultivares mais plantada principalmente nas áreas de melhor nível técnico, sendo predominante nos perímetros irrigados (CORDEIRO & MOREIRA, 2006).

FHIA-02 é um tetraplóide com genoma AAAA, introduzida de Honduras, pertencente ao subgrupo Cavendish (Williams x SH33-93), porte baixo, ciclo vegetativo variando de 320 a 350 dias, bom perfilhamento e com cachos que podem atingir até 60 kg com mais de 10 pencas. Possui resistência às sigatokas negra e amarela, sendo suscetível ao mal-do-Panamá. (DONATO et al., 2006).

A cultivar Calypso, pertencente ao grupo genômico AAAA é um híbrido de Gros Michel, originário da Jamaica, com porte médio, com resistência à Sigatoka-negra e ao mal-do-Panamá (LIMA et al., 2005).

As variedades Maravilha e Prata Graúda são híbridos tetraplóides (AAAB) de Prata Anã obtidas na Federación Hondureña de Investigación Agrícola (FHIA), em Honduras. A cultivar de bananeira Prata Graúda (SH3640) apresenta porte médio a alto. Foi introduzida no Brasil na década de 90, pela Embrapa Mandioca e Fruticultura. Seus frutos possuem tamanho superior aos da 'Prata-Anã', apresentam polpa de coloração creme com sabor e aroma semelhantes aos dessa cultivar. Produz aproximadamente 30% a mais que a Prata Anã. Apresenta resistência ao mal-do-Panamá, porém é suscetível às sigatokas amarela e negra. Já a variedade Maravilha (FHIA 01) foi avaliada em vários locais e selecionada pela Embrapa Mandioca e Fruticultura para a região de Rio Branco (AC). Os frutos são mais ácidos e a produção são maiores que os da Prata Anã. Apresenta resistência a Sigatoka-negra e ao mal-do-Panamá e moderada suscetibilidade à Sigatoka-amarela (OLIVEIRA & SILVA et al., 2008).

As cultivares Pacovan Ken, Japira, Vitória e Preciosa (PV42-85) são híbridos tetraplóides com genoma AAAB resultantes do cruzamento da cultivar Pacovan (AAB), com o híbrido diplóide M53 (AA), desenvolvidas pela Embrapa Mandioca e Fruticultura. Estas cultivares apresentam número e tamanho de frutos e produtividade superiores além de possuírem frutos mais doces que os da Pacovan. As cultivares são resistentes à Sigatoka-amarela, Sigatoka-negra e ao mal-do-Panamá. A depender do local, as cultivares apresentam comportamentos distintos, o que levou a sua seleção em regiões diferentes (OLIVEIRA & SILVA et al., 2008). O nome Ken é uma homenagem ao seu criador, Dr. Kenneth Shepherd.

A variedade Tropical é um híbrido tetraplóide com genoma AAAB, de

porte médio a alto, resultante do cruzamento da cultivar Yangambi nº 2 com um híbrido diplóide, desenvolvido pela Embrapa Mandioca e Fruticultura. Os frutos são semelhantes aos da cultivar Maçã. A Tropical, além de resistente à Sigatoka-amarela, é também tolerante ao mal-do-Panamá. As características organolépticas dessa variedade são diferentes entre as regiões, sendo que no Norte de Minas é bastante semelhante a cultivar Maçã (BORGES et al. 2006).

A variedade Caprichosa, (BRS Caprichosa ou PC42-01) é um híbrido tetraplóide com genoma AAAB, obtida pela Embrapa Mandioca e Fruticultura, resultante do cruzamento entre Prata Comum (AAB) x diplóide M53 (AA) lançada em 2004 e possui porte alto. Os frutos têm sabor adocicado com acidez semelhante aos da cultivar Prata Comum. A planta apresenta resistência às sigatokas amarela e negra e ao mal-do-Panamá (OLIVEIRA & SILVA et al., 2008).

A variedade Garantida (BRS Garantida) é um híbrido tetraplóide com genoma AAAB, obtida pela Embrapa Mandioca e Fruticultura resultante do cruzamento entre Prata São Tomé (AAB) x diplóide M53 (AA). Possui porte alto. Seus frutos e produção são superiores aos das cultivares Prata São Tomé e Prata Comum. Apresenta resistência às sigatokas amarela e negra e ao mal-do-Panamá (OLIVEIRA & SILVA et al., 2008).

Em 2008, a Embrapa Tabuleiros Costeiros em parceria com a Embrapa Mandioca e Fruticultura, lançou a cultivar Princesa. Ela é um híbrido tetraplóide com genoma AAAB resultante do cruzamento da cultivar Yangambi nº2 com o diplóide M53. A cultivar foi avaliada em Propriá (SE) e em Cruz das Almas (BA). Essa cultivar atinge uma produtividade em torno de 15 a 20 t/ha e apresenta porte menor que o da Maçã. Possui a vantagem de ser tolerante ao mal-do-Panamá, além de ser resistente à Sigatoka-negra. A cultivar vem atender a demanda por frutos do tipo Maçã, em escassez devido a sua suscetibilidade ao mal-do-Panamá (OLIVEIRA & SILVA et al., 2008).

O PA 42-44 é um híbrido tetraplóide com genoma AAAB, tipo Prata, (Prata Anã x M53), resistente a sigatokas amarela e negra (BORGES et al. 2006). Foi desenvolvido pela Embrapa por meio do programa de melhoramento genético de bananeira no Brasil (DONATO et al., 2006). Apresenta bom perfilhamento, porte médio e características tanto de desenvolvimento quanto de rendimento idênticas às da Prata Anã. Sua produtividade média é de 20

t/ha/ano. Sob condições de solo de boa fertilidade, apresenta rendimento médio de até 40 t /ha/ano. Difere da Prata Anã por ser resistente a Sigatoka-amarela e ao mal-do-Panamá (SILVA et al., 2008).

O FHIA 21 é um híbrido tetraplóide AAAB, tipo Terra obtido em Honduras. Apresenta pseudocaule verde com manchas arroxeadas, porte médio a alto, cachos cilíndricos, frutos quase eretos, com pedicelo grosso, quinhas bem definidas, com casca verde claro quando verde e amarelo claro quando maduro e coração que vai reduzindo de tamanho à medida que os frutos se desenvolvem. Os frutos apresentam polpa tipicamente rosada e menos firme que das outras cultivares do subgrupo Terra. A cultivar é resistente às sigatocas amarela e negra e ao mal-do-Panamá sendo muito suscetível à broca (<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br>. Acesso em: 23 mar. 2011).

A cultivar FHIA-18, tetraplóide AAAB, introduzida de Honduras, produz frutos tipo Prata. Apresenta porte médio, ciclo vegetativo de 353 dias, bom perfilhamento, os cachos podem atingir até 40 kg, com mais de 10 pencas. É resistente à Sigatoka-negra, moderadamente resistente à Sigatoka-amarela e suscetível ao moko e ao mal-do-panamá (FRANCELLI, 2003).

## 1.6 VIROSES E A INDEXAÇÃO DE PLANTAS

As viroses constituem um grupo importante de pragas de plantas, sendo causadores de doenças extremamente danosas para a agricultura. Até o momento, somente o *Banana streak virus* e o *Cucumber mosaic virus* foram registrados em bananeiras cultivadas no Brasil (FIGUEIREDO & BRIOSO, 2007; COLARICCIO et al., 2006). Entretanto todo cuidado deve ser tomado quanto as outras viroses que afetam a bananeira no mundo, tendo em vista o grande fluxo de mudas importadas que tem ocorrido no Brasil, oriundas de laboratórios localizados na África, Europa, Ásia e América Central, regiões onde outras viroses foram relatadas em bananeiras (FIGUEIREDO et al., 2003; MARINHO & BATISTA, 2005).

A dificuldade de detecção, identificação e posterior erradicação destes vírus, tornam o princípio da prevenção da doença, através da exclusão da

praga, extremamente importante. Entre os doze vírus já relatados em bananeiras os mais difundidos são: o *Banana bunch top virus* (BBTV), o *Banana streak virus* (BSV), o *Banana bract mosaic virus* (BBrMV), o *Banana mild mosaic virus* (BanMMV) e o *Cucumber mosaic virus* (CMV) (ATKINSON et al., 2003).

Dentre os vírus de bananeira exóticos para o Brasil, encontram-se o BBTV, família *Circoviridae*, gênero *Nanavirus*, praga de quarentena A1 para o Brasil (MAPA, Instrução Normativa SDA N° 38, 14 de outubro 1999), que ocorre em vários países da Ásia, África, Oceania e Havaí, transmitido de forma persistente pelo afídeo *Pentalonia nigronervosa* Coquerel, e o BBrMV, família *Potyviridae*, gênero *Potyvirus*, que, não ocorre no Brasil e não está regulamentado como praga de quarentena (MARINHO & BATISTA, 2005).

O BanMMV (THOMAS et al., 2000; GAMBLEY & THOMAS, 2001), família *Flexiviridae*, tem se mostrado difundido entre germoplasma de *Musa* e plântanos, assim como tem sido observado em bananas da África, América, sudeste da Ásia, e Austrália (LOCKHART, 1995; THOMAS et al., 2000).

As viroses são geralmente gerenciadas por medidas de controle integrado, incluindo plantio de mudas sadias produzidas em viveiros, e adotando-se medidas para prevenir sua reinfecção pela eliminação de fontes de inóculo e controle de vetores.

Alguns grupos têm procurado desenvolver bananeiras transgênicas para resistência a vírus. Eles são a Universidade de Tecnologia de Queensland (QUT) visando resistência a BBTV e ao BBrMV, a Universidade de Hawaii (UH) buscando resistência ao BBTV e o John Innes Institute (JIC) que desenvolve plantas resistentes ao BSV. O primeiro exemplo de resistência a vírus pelo uso de plantas transgênicas publicado em 1986 (ABEL et al., 1986, citado por ATKINSON et al., 2003) foi a produção de fumo com resistência ao vírus do mosaico do fumo pelo uso da capa protéica.

### **1.6.1 *Cucumber mosaic virus***

O CMV causa a doença conhecida como clorose infecciosa, que foi descrita pela primeira vez na Austrália por Magee em 1930 (CORDEIRO et al., 2004). Desde então, ela tornou-se largamente disseminada pelo mundo, e

atualmente considera-se que ocorra em todas as regiões onde se cultiva banana. É um dos vírus mais comuns na natureza (FIGUEIREDO & BRIOSO, 2007). No Brasil, a ocorrência do CMV em bananeira foi relatada nos estados de Pernambuco (MEDEIROS, 1963), Rio de Janeiro (RIBEIRO et al., 1975), Ceará (LIMA & GONÇALVES, 1988), Minas Gerais (MACIEL-ZAMBOLIM et al., 1994), São Paulo (COLARICCIO et al., 1996) e Pará (TRINDADE et al., 1998).

O *Cucumber mosaic virus* possui partículas isométricas com 28 a 30 nm de diâmetro, é um vírus de RNA fita simples, senso positivo com genoma tripartido (PALUKAITIS et al., 1992) pertence ao gênero *Cucumovirus*, família *Bromoviridae* (FAUQUET et al., 2005).

As estirpes do CMV foram divididas nos subgrupos I e II, com base em dados sorológicos, mapeamento de peptídeos da capa protéica (CP), e hibridização de ácido nucléico (EDWARDS & GONSALVES, 1983; OWEN & PALUKAITIS, 1988; WAHYUNI et al., 1992). A análise filogenética do CMV usando o gene da capa protéica e a sequência da região não traduzida na extremidade 5' confirmou o agrupamento e também levou à subdivisão do subgrupo I em IA e IB (ROOSSINCK et al., 1999), e a subdivisão entre os subgrupos IA e IB foi relatada (CHEN et al., 2007).

A análise em gel de eletroforese de RNA isolados de vírions de CMV levaram a identificação de três grandes RNAs genômicos (1, 2 e 3) e um pequeno RNA subgenômico, o RNA 4 (PEDEN & SYMONS, 1973; HABILÍ & FRANCKI, 1974). RNA 4 é derivado do RNA 3.

O CMV não é considerado um vírus quarentenário, pois encontra-se disseminado mundialmente. 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).

O CMV possui cinco *Open reading frames* (ORFs) (Figura 3). A ORFs 1a e 2a, codificada no RNA 1 e 2, respectivamente, são os componentes virais relacionados com a replicação. A ORF 2b, um gene que se sobrepõe a ORF 2a, é expressa a partir de um RNA subgenômico, RNA 4A, codificando uma proteína de 15 KDa (DING et al., 1994) e também codifica um gene supressor de silenciamento pós transcricional (BRIGNETI et al., 1998). O RNA 3 codifica a proteína 3a, a proteína de circulação viral e da capa protéica, expressa a

partir de RNA 4 subgenômico (EDWARDSON-CHRISTIE, 1991; PALUKAITIS et al., 1992; ROOSSINCK, 2001).

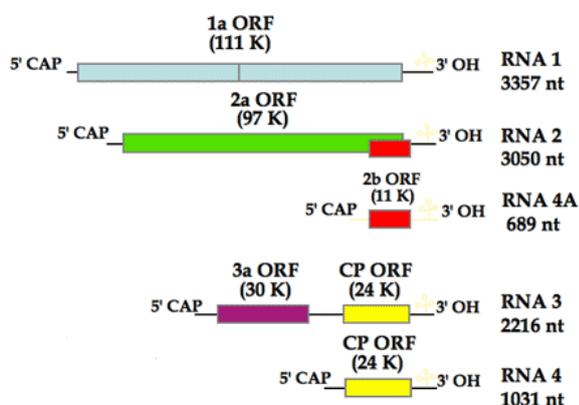


Figura 3. Organização do genoma de CMV. Número de nucleotídeos (nt) e tamanho das proteínas estão em preto. K = kilodalton (ROOSSINCK, 2002).

Algumas estirpes de CMV contêm um RNA satélite, conhecido por CARNA 5 (WOOD & COUTTS, 1975; LOT & KAPER, 1976; HANADA & TOCHIHARA, 1980; GAFNY et al., 1996). O *Cucumber mosaic virus satélite* RNA, um dos mais estudados, geralmente atenua os sintomas da infecção pelo CMV (ZERMINI JR. et al., 2006). A presença de CARNA 5 é geralmente associada a baixas concentrações do vírus em plantas infectadas e diminui a sua eficiência de transmissão. Em bananeiras infectadas com CMV este RNA satélite pode atenuar ou exacerbar os sintomas (KAPER & TOUSIGNANT, 1977; GAFNY et al., 1996.; ESCRIU et al., 2000).

Os principais vetores do CMV são os pulgões *Aphis gossypii*, *Myzus persicae* e *Rhopalosiphum spp.* (LOCKHART & JONES, 2000) que transmitem o vírus de forma não persistente. O CMV tem a gama mais ampla de hospedeiros de qualquer vírus conhecido, infectando mais de 1.000 espécies de plantas, incluindo monocotiledôneas e dicotiledôneas, plantas herbáceas, arbustos e árvores (EDWARDSON & CHRISTIE, 1991). Numerosas estirpes de CMV foram caracterizadas e podem ser encontradas em todas as partes do mundo. Assim, o CMV pode ser considerado um vírus cosmopolita e com versatilidade para se adaptar a novos hospedeiros e ambientes (ROOSSINCK, 2002).

Em hortaliças, na maioria das vezes, a transmissão do CMV isoladamente é mais eficiente do que em mistura com outros vírus, tanto através de aquisição simultânea como seqüencial (PINTO, 2004). A trapoeraba (*Commelina sp.*) é hospedeira do CMV (BOARI et al., 2000) e pode constituir fonte de inóculo do mesmo patógeno em pomares.

O CMV é considerado como uma virose de importância econômica em aipo, cucurbitáceas, alface, pimenta, tomate, várias leguminosas, plantas ornamentais e banana. Desta forma, faz-se necessário um controle das culturas próximas ao bananal, além do controle também dos vetores através de monitoramento, eliminação de hospedeiros ou através de controle biológico. Esta virose aparece como uma das mais importantes em culturas anuais da Argentina, Leste da China, Croácia, França, Egito, Grécia, Israel, Itália, Japão, Portugal, Espanha e algumas regiões dos Estados Unidos (GALLITELLI, 2000).

Algumas estirpes de CMV não são transmissíveis ou são transmitidas de forma ineficiente por pulgões. Essas diferenças na transmissibilidade são, provavelmente, não só atribuíveis a variações na composição de aminoácidos do capsídeo do vírus, mas também devido a segmentos específicos do genoma cuja estrutura pode afetar a interação proteína/proteína ou RNA/proteína (GALLITELLI, 2000).

Os sintomas da infecção pelo CMV incluem a produção de estrias amarelas ou esverdeadas entre as nervuras, que pode ser confundida com deficiência de zinco, e a formação de mosaico nas folhas, ocorrendo o enrolamento dos seus bordos. Em períodos frios com temperaturas abaixo de 24°C, pode ocorrer a necrose das folhas centrais e do centro do pseudocaule e até morte de plantas. As plantas infectadas podem não produzir frutos ou eles apresentarem manchas ou anéis necróticos. As plantas severamente afetadas produzem cachos ou frutos mal formados, pouco desenvolvidos e com maturação irregular. Em algumas bananeiras os sintomas podem ser suprimidos por temperaturas elevadas (PEREIRA et al., 1999; PLOETZ, 1994, citado por MEISSNER FILHO, 2009).

Infecção pelo CMV em *Musa* pode ser detectada por ELISA (*Enzyme linked immunosorbent assay*), utilizando anticorpos mono ou policlonais, ou por testes de transcrição reversa seguidos da reação em cadeia da polimerase (RT-PCR) (DIEKMANN & PUTTER, 1996) e pela leitura de sintomas.

No controle integrado do CMV, recomenda-se o plantio no campo de mudas de cultura de tecidos com tamanho em torno de um metro, uma vez que mudas pequenas e novas são muito atrativas para os pulgões (JONES & ISKRA, 1993), o uso de plástico brilhante para repelir pulgões, controlar ervas daninhas, evitar plantio de mudas de bananeira próximas a hortaliças e outras culturas hospedeiros do vírus, bem como a remoção precoce de plantas infectadas (GRAVENA, 2003).

Para outras culturas já foram produzidas plantas transgênicas com resistência ao CMV pela proteína da capa protéica, o que até o momento não foi feito para bananeira (ATKINSON et al., 2003).

### **1.6.2 *Banana streak virus***

O *Banana streak virus* (BSV), família *Caulimoviridae*, gênero *Badnavirus*, é o agente causal da doença conhecida como estrias-da-bananeira (KIMATI et al., 2005). Atualmente, são reconhecidas pelo ICTV (International Committee on Taxonomy of Viruses) três espécies do BSV: o *Banana streak Mysore virus*, o *Banana streak OL virus* e o *Banana streak GF virus* (ICTVdB, 2011).

O BSV apresenta partículas baciliformes com largura de 30 nm e comprimento que varia de 120 a 150 nm (HULL et al., 2005). Possui genoma composto de DNA circular de fita dupla com tamanho aproximado de 7,4 kb e três ORFs (*Open reading frames*) (Figura 4). As ORF I e II potencialmente codificam duas pequenas proteínas (22,8 kDa e 14,5 kDa, respectivamente) de funções desconhecidas. A ORF III codifica uma poliproteína de 208 kDa consistindo numa provável proteína de movimento célula a célula, proteína capsidial, protease aspártica e uma replicase viral, a qual possui funções de transcriptase reversa e ribonuclease H. Acredita-se que esta poliproteína após a sua tradução é clivada em suas unidades funcionais pela protease aspártica (HARPER & HULL, 1998).

Estudos recentes revelaram que sequências virais podem ocorrer dispersas no genoma de plantas, originárias de uma infecção viral anterior que se fixou na linhagem parental (GAYRAL & ISKRA-CARUANA, 2009). O genoma do BSV possui habilidade de se integrar ao genoma da bananeira

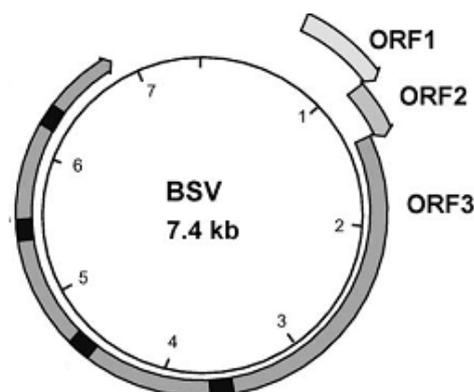


Figura 4. Organização do genoma do BSV. O círculo completo representa o genoma de DNA de fita dupla. Em preto são indicadas as sequências conservadas de Badnavirus. As posições das três ORFs de BSV são dadas por setas cheias (HARPER et al., 2004).

(LOCKHART & JONES, 2000). A inserção e presença do BSV (genoma completo) no genoma B (*Musa balbisiana*), já foi comprovada (PLOETZ et al., 2003), porém o mecanismo desta integração ainda é desconhecido, visto que nenhum fitovírus descrito até agora exige um passo de integração como parte de sua replicação (STAGINNUS & RICHERT-PÖGGELER, 2006).

NDOWORA et al. (1999), comprovaram a presença, no genoma da bananeira, de EPRV (endogenous pararetroviral sequences) que são sequências virais integradas ao genoma de plantas. Para o genoma da bananeira, já foram descritos dois tipos de EPRV relacionados ao BSV: um tipo que contém o genoma completo do vírus e que pode originar partículas virais e causar infecção episomal; e outro tipo com sequências incompletas do BSV, não relacionadas à manifestação da doença (JAUFEEERALLY-FAKIM et al., 2006). A hipótese de que a propagação *in vitro* pode atuar como desencadeadora da infecção a partir das EPRV ganhou força com estudos realizados por DALLOT et al. (2001) e CÔTE et al. (2010), ainda que os mecanismos para que tal evento ocorra não sejam entendidos.

Acredita-se que o BSV esteja distribuído mundialmente em *Musa spp.* (LOCKHART & OLSZEWSKI, 1993), e até recentemente não era considerado um problema sério para a cultura da banana. O primeiro registro da doença foi na Costa do Marfim em 1966 (LASSOUDIÈRE, 1974), mas o agente causal desta virose não foi isolado até 1986 (LOCKHART 1986). Posteriormente o BSV foi detectado na Nigéria, Tanzânia, Madagascar, Brasil, Índia, Áustria, Guadalupe e Cuba (ARIAS et al., 2002).

Desde então, a doença foi e continua sendo registrada em muitos países (JONES & LOCKHART, 1993; DIEKMANN & PUTTER, 1996; TUSHMEREIRWE et al., 1996; LOCKHART & JONES 2000). O vírus causa uma extensa gama de sintomas e danos com conseqüências que variam de moderado a severo. Em Uganda, foi registrada uma epidemia séria do vírus em 1996, com algumas plantações que continham 100% de plantas infectadas (TUSHMEREIRWE et al., 1996). Quando associado a vírus de partícula filamentosa, provavelmente o BanMMV, os danos apareceram de forma mais severa.

No Brasil, o BSV foi primeiramente descrito em bananeiras por Brioso et al. (2000) e posteriormente, por Marinho & Batista (2005), em mudas de bananeira provenientes de cultura de meristemas, importadas da Costa Rica. Foi relatado também em várias cultivares de bananeiras (pertencentes a diferentes grupos genômicos AA, AAA, AAB, ABB, AAAB, AABB) em infecções simples ou em associação com o CMV, em amostras provenientes da Bahia, Ceará, Espírito Santo, Goiás, Minas Gerais, Rio de Janeiro, Santa Catarina e São Paulo (BRIOSO, 2004).

Mesmo que inicialmente não tenha sido considerado economicamente importante, nos últimos anos o BSV tem despertado preocupação devido ao aumento de relatos de infecção nas cultivares de bananeira e híbridos micropropagados (LE PROVOST et al., 2006). Genótipos resultantes de cruzamentos entre *M. acuminata* e *M. balbisiana*, incluindo uma variedade de novos híbridos mostraram a tendência de produzir propágulos infectados pelo BSV, mesmo utilizando-se plantas assintomáticas em cultura de tecidos (DALLOT et al., 2001).

No mundo, o BSV foi descrito infectando bananeiras dos grupos AA, AB, AAA, AAB, AABB e AAAB. No Brasil foram relatadas quatro estirpes de BSV e este infecta principalmente, a variedade Mysore (AAB) (CORDEIRO & MATOS, 2003). O vírus não é transmitido de forma mecânica. Para Lockhart (1995), a não transmissão mecânica do BSV pode ser atribuída aos altos níveis de compostos fenólicos e látex presente em *Musa*. Ele é transmitido principalmente por mudas infectadas e, de forma semi persistente pelas cochonilhas *Planococcus citri* e *Pseudococcus sp.* (LOCKHART & JONES, 2000) e *Saccharicoccus sacchari* (PIETERSEN & THOMAS, 2001). Os

sintomas de estrias descoloridas ao longo das nervuras das folhas, inicialmente podem ser confundidos com aqueles causados pelo CMV, porém com o desenvolvimento da doença as estrias tornam-se necróticas ao longo do limbo foliar (COLARICCIO, 2009).

Com experimentos de transmissão, identificou-se dois novos vetores para o BSV, a *Pseudococcus comstocki* Kuwana e a *Dysmicoccus brevipes* Cockerell. A aquisição do vírus pela cochonilha foi detectada utilizando-se a PCR, onde foram analisadas cochonilhas adultas, ninfas e ovos (SU, 1999).

O *P. comstocki* é um coccídeo de larga distribuição geográfica, existindo em vários países do mundo. No Brasil já foi encontrado no Distrito Federal, e nos Estados do Rio de Janeiro e de São Paulo. Tem aspecto característico das espécies do gênero *Pseudococcus*, sendo o seu corpo revestido de uma cera farinácea que nas bordas do corpo se prolonga em filamentos finos correspondentes a grupos de glândulas cericígenas existentes no tegumento. Além do citros, essa espécie é encontrada em outros hospedeiros, como bananeira (*Musa* sp.), pereira (*Pyrus comunis*), batata (*Solanum* sp.), cafeeiro (*Coffea arabica*), na planta ornamental *Clivia miniata* e em várias espécies de plantas daninhas, particularmente *Cyperus rotundus*, conhecida como tiririca (SILVA et al., 1968).

No Brasil *P. comstocki* nunca foi observado em outros hospedeiros senão nas plantas cítricas. Em muitos pomares, os capins e as ciperáceas, principalmente a tiririca (*Cyperus rotundus*) apresentam as raízes frequentemente atacadas por um *Pseudococcus*, mas a espécie não é a mesma que ataca as laranjeiras, geralmente é *P. brevipes* (<http://www.acervodigital.ufrj.br/>. Acesso em: 06 abr. 2011).

Em experimentos realizados por Silveira et al. (2006) usando cochonilha *P. citri* como vetora, os sintomas da infecção pelo BSV em mudas micropropagadas de bananeira da cultivar Caipira, foram visíveis 15 dias após a inoculação, sendo que 100 % das plantas inoculadas apresentaram sintomas. Esses resultados foram semelhantes aos obtidos por Soares et al. (2000) quando inocularam plantas da cultivar Caipira com o BSV usando a mesma espécie de cochonilhas. Nesta ocasião plantas de Mysore com sintomas de BSV e de Caipira micropropagadas foram avaliadas por PCR verificando-se que a Mysore utilizada nos experimentos estava infectada pelo BSV e as

mudas de Caipira apresentavam-se sadias. Ainda segundo os mesmos autores os sintomas permaneceram visíveis nas plantas inoculadas durante toda a fase experimental. Ramirez & Rivera (1994) observaram os mesmos sintomas em plantas de bananeira infectadas com BSV usando *P. citri* e mantidas em campo.

Os métodos atualmente utilizados para a detecção do BSV são: a inspeção visual periódica da presença dos sintomas, imunomicroscopia eletrônica de transmissão, ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*), PCR (Polymerase Chain Reaction), IC-PCR (*Immunocapture-PCR*) (LOMBARDI, 2010) e recentemente o RCA (Rolling-circle amplification) (JAMES, et al., 2011).

Para controle do BSV devem-se utilizar mudas indexadas e instalar os novos bananais em áreas livres de plantas daninhas, de insetos vetores e realizar inspeções periódicas. Nos casos de plantas já infectadas recomenda-se a sua erradicação (CORDEIRO et al., 2004). Há apenas um grupo (John Innes Institute – JIC), tentando gerar resistência ao BSV pela produção de plantas transgênicas. A heterogeneidade de BSV epissomal torna o desenvolvimento de resistência genética um grande desafio (ATKINSON et al., 2003).

#### **1.6.2.1 A COCHONILHA VETORA *Planococcus citri***

Dentre os gêneros da família *Pseudococcidae*, destaca-se o gênero *Planococcus*, cujas espécies são consideradas importantes pragas em vários agroecossistemas (CORREA, 2006). Esse gênero é originário do Velho Mundo e contém 43 espécies descritas (BEN-DOV, 1994), sendo que seis ocorrem nas Américas Central e do Sul (WILLIAMS & WILLINK, 1992) destacando-se *P. citri* conhecida como cochonilha branca, cochonilha-farinhenta ou cochonilha-dos-citros.

Os insetos da família *Pseudococcidae* são conhecidos como cochonilhas farinhentas por apresentarem o corpo recoberto por uma secreção pulverulenta de cera branca (RIPA & RODRIGUEZ, 1999). É um inseto sugador de seiva que coloniza especialmente a região do pedúnculo dos frutos, produz o

*honeydew*, que serve como substrato para o desenvolvimento da fumagina, acarretando a depreciação dos frutos comercializados (GRAVENA, 2003).

A cochonilha *P. citri* apresenta uma ampla distribuição geográfica, ocorrendo em regiões tropicais, subtropicais e temperadas, portanto, em todo o Brasil, colonizando plantas cultivadas em condições de campo e casa de vegetação. É uma praga polífaga, isto é, ataca diversas espécies vegetais. Infesta, por exemplo, anonáceas (pinha, fruta-do-conde, atemóia, etc.), café (arábica e robusta), goiaba, algodão, videiras, etc. Outras culturas atacadas são: banana, carambola, coco, gengibre, macadâmia, manga e as plantas do gênero *Citrus* em geral (LLORENS, 1990 citado por GRAVENA, 2003).

Segundo Balachowsky (1935) citado por Morandi Filho (2008), já era considerada, na época, um dos insetos fitófagos mais agressivos aos pomares frutíferos. Atacava também, figo, *Robinia*, *Pittosporium*, *Platanus* e plantas cultivadas em estufas, como antúrios, orquídeas, cactáceas e bromeliáceas.

Os danos diretos provocados pelas cochonilhas são resultantes da ação das picadas e, sobretudo, da ação tóxica da saliva, não diferindo dos danos causados pelos demais hemípteros. Os danos indiretos estão relacionados com a secreção açucarada desses insetos, que se depositam nas folhas favorecendo ao desenvolvimento da fumagina (*Capnodium citri* Berk & Desm.), a qual prejudica a fotossíntese e a respiração das plantas (COSTA LIMA, 1942).

No Brasil, a ocorrência da cochonilha *P. citri* foi relatada nas culturas de graviola, atemóia, fruta do conde, goiabeira, figueira, videira, mangueira, dentre outras (WILLIANS & WILLINK, 1992), e em plantas de citros (SILVA et al., 1968; GRAVENA, 2003).

### 1.6.3 MÉTODOS DE INDEXAÇÃO DE VIROSES

Indexar é demonstrar a presença ou não de uma virose conhecida nas plantas em análise. No mundo há milhares de viroses descritas, cada uma possuindo uma específica gama de hospedeiros. A sintomatologia produzida varia bastante, dependendo do vírus ou da estirpe presente, da planta infectada e das condições do ambiente. Vários métodos podem ser utilizados para esta finalidade, como a inoculação mecânica ou por enxertia de plantas

indicadoras, sorologia por ELISA, exame de amostras no microscópio eletrônico ou detecção da presença do DNA/RNA viral por reação em cadeia da polimerase (PCR/RT-PCR) (MEISSNER FILHO, 2009).

Segundo Lockhart & Olszewski (1993), entretanto, tais metodologias podem levar a resultados falsos negativos quando aplicadas na detecção do BSV. Além disto, o BSV apresenta um alto grau de heterogeneidade genômica e sorológica entre seus isolados. Tal heterogeneidade impõe uma séria restrição quanto a utilização de técnicas sorológicas e moleculares para a sua detecção.

### **1.6.3.1 LEITURA DE SINTOMAS**

Embora a sintomatologia seja o mais fácil dos métodos de detecção de viroses e outras doenças, bem como pragas, nem sempre é confiável. Em alguns casos, os sintomas clássicos podem ser exibidos permitindo a identificação exata da virose envolvida. No entanto, pode ocorrer mais de uma virose na planta ao mesmo tempo, o que pode alterar os sintomas expressos. Sintomas causados por vírus diferentes podem ser semelhantes e em alguns hospedeiros infectados eles podem até ser assintomáticos (THOMAS, 1998). A indexação com base na sintomatologia pode levar a erros de interpretação, uma vez que os sintomas causados por viroses podem ser confundidos com os produzidos por outros fatores como deficiência mineral, fitotoxidez. Além disso, plantas com infecção latente não serão detectadas (MEISSNER FILHO, 2009).

### **1.6.3.2 MÉTODO BIOLÓGICO**

Nesse método, utilizam-se plantas que exibem sintomas característicos quando são inoculadas com um determinado vírus, as quais são chamadas de plantas indicadoras (TORRES et al., 1998; BRIOSO, 1986 citado por SILVEIRA, 2001). As plantas indicadoras para as viroses podem ser utilizadas basicamente de duas maneiras: inoculadas mecanicamente com o extrato tamponado das folhas da planta a ser testada ou sendo enxertadas com tecidos das plantas em teste (STEVENS, 1983 citado por MEISSNER FILHO, 2009). Para viroses que não são transmitidas mecanicamente ou não é

possível utilizar enxertia, uma alternativa de indexá-las com plantas indicadoras é a utilização do seu inseto vetor nos testes de transmissão para detectar a presença de vírus nas amostras em análise (SILVEIRA et al., 2008).

O estado nutricional e um bom desenvolvimento são importantes para que a planta indicadora apresente sintomas claros. Além disso, a planta deve ser cultivada em ambiente que propicie a expressão dos sintomas das viroses presentes, cuidando-se principalmente para as variações de temperatura (FRISON, 1994 citado por MEISSNER FILHO, 2009). São métodos relativamente baratos e sensíveis, mas exigem a manutenção de lotes de plantas indicadoras para os testes, cujos resultados demoram de semanas a meses. Também é necessário que as plantas sejam cultivadas em telados ou casa de vegetação a prova de insetos para realização dos trabalhos (MEISSNER FILHO, 2010).

### **1.6.3.3 MÉTODO SOROLÓGICO**

Os métodos sorológicos constituem a ferramenta mais comumente utilizada para a identificação rápida, simples e precisa da grande maioria dos vírus de plantas. A maior limitação para o uso da sorologia é a disponibilidade de anti-soros de boa qualidade. A obtenção desses anti-soros depende da purificação das partículas virais, um processo longo e trabalhoso, que pode levar a resultados insatisfatórios caso componentes da planta não sejam totalmente eliminados. Entretanto considerando a simplicidade e eficiência das técnicas sorológicas, a pronta disponibilidade de muitos anti-soros deveria ser uma prioridade em todos os laboratórios envolvidos na diagnose de viroses vegetais. O ELISA (*Enzyme-linked immunosorbent assay*) é hoje padrão em testes sorológicos, em razão de sua sensibilidade, versatilidade e simplicidade (ZERBINI JR. et al., 2006).

No ELISA direto, ou sanduíche duplo de anticorpos (Double Antibody Sandwich ELISA, DAS-ELISA) inicialmente o anticorpo livre é adicionado às cavidades da placa e incubado a 37°C, para que ocorra a adsorção do IgG às cavidades da placa. O excesso de anticorpo é removido com lavagens sucessivas. Em seguida, é adicionado o antígeno, na forma de extrato vegetal tamponado. Após nova incubação, o excesso de material é removido e, em

seguida, o anticorpo conjugado a uma enzima (normalmente fosfatase alcalina ou peroxidase) é adicionado. Em amostras contendo o vírus de interesse, o vírus presente no extrato vegetal terá que se ligar ao anticorpo inicialmente adicionado, e o conjugado anticorpo-enzima, ao vírus. Em amostras sadias, o conjugado não se ligará a nenhum antígeno e será removido com a lavagem. Finalmente, adiciona-se o substrato da enzima, normalmente um composto incolor. Caso o conjugado esteja presente, a enzima converterá o substrato em um composto de cor amarela, caso esta enzima seja a fosfatase alcalina. A intensidade da cor será proporcional à quantidade de antígeno presente na amostra (ZERBINI JR. et al., 2006).

O CMV possui dois grandes sorogrupos. Há disponibilidade de anti-soros específicos para cada subgrupo do CMV. Como os dois subgrupos ocorrem em bananeira os anticorpos policlonais são mais indicados para indexação, pois conseguem detectar os dois subgrupos do CMV. Anticorpos policlonais e monoclonais foram desenvolvidos para o BBTv, BSV, CMV, BBrMV (DIEKMANN & PUTTER, 1996).

#### **1.6.3.4 MÉTODO MOLECULAR**

O avanço mais significativo na indexação de vírus em plantas foi o advento da reação em cadeia da polimerase (PCR). Este é um ensaio muito sensível, mas que não deixa de ter seus problemas. Componentes da seiva de bananeira podem inibir a reação e, também, é necessário algum conhecimento sobre o genoma do vírus em estudo (THOMAS, 1998). A PCR é mais sensível do que os métodos sorológicos, mas para sua realização são necessários alguns equipamentos, e pessoal treinado. A técnica tem um custo maior do que o ELISA e o preparo das amostras para o teste é mais trabalhoso do que os métodos sorológicos, uma vez que é necessário o isolamento do RNA ou DNA da amostra. A RT-PCR/PCR detecta o RNA/DNA do vírus em análise e para tanto é necessário conhecer pelos menos parte da sequência deste vírus. Com esta informação é possível mandar sintetizar oligonucleotídeos que serão utilizados para sua detecção (ZERBINI & ALFENAS-ZERBINI, 2007).

Quando a sequência a ser detectada é constituída de RNA, como é o caso da grande maioria dos vírus de plantas, a reação PCR deve ser precedida

de uma transcrição inversa do RNA viral (RT) em DNA complementar (cDNA). O método de RT-PCR foi utilizado por Hu et al. (1995) para detecção do CMV em bananeira.

Uma reação de PCR é composta de ciclos, contendo três passos cada um. Inicialmente, a reação é aquecida a 94°C por 30 segundos a 1 minuto (desnaturação), para que as fitas duplas de DNA se separem. Em seguida, a reação é incubada a 37-60°C por 1-2 minutos (anelamento), para que os oligonucleotídeos se alinhem com o DNA. Finalmente, a reação é incubada a 72°C por 1 a 3 minutos (extensão), para que a DNA polimerase sintetize as novas moléculas de DNA (ZERBINI JR. et al., 2006).

A sequência dos oligonucleotídeos utilizada vai depender do que se deseja amplificar e é a responsável pela especificidade da reação. Por exemplo, caso a sequência dos oligonucleotídeos corresponda a regiões altamente conservadas do genoma viral, fragmentos de diferentes estirpes ou mesmo espécies serão amplificados. Ao contrário, caso a sequência dos oligonucleotídeos corresponda a regiões variáveis do genoma, apenas a estirpe que deu origem aos oligonucleotídeos terá o fragmento amplificado. Após o término da reação PCR, o produto de amplificação é submetido a eletroforese em gel de agarose a 1%, corado com brometo de etídio e observado sob luz ultra-violeta. A detecção de bandas e seu tamanho indicam que a amostra contém ou não o vírus em análise (ZERBINI JR. et al., 2006).

---

## **CAPÍTULO 2**

**Indexação de bananeira para o *Cucumber mosaic virus E*  
*Banana streak virus***

---

## RESUMO

### **SANTOS, N. M. Indexação de bananeira para o *Cucumber mosaic virus* e *Banana streak virus***

A bananeira pode ser afetada por muitas doenças, a exemplo mosaico do pepino causado pelo *Cucumber mosaic virus* (CMV) e da estrias da bananeira causada pelo *Banana streak virus* (BSV). O controle de viroses baseia-se principalmente no uso de mudas livres do vírus. Portanto, torna-se importante o uso e aperfeiçoamento das técnicas de indexação. Este trabalho objetivou indexar o matrizeiro de bananeira da Embrapa Mandioca e Fruticultura para o CMV e BSV por diferentes métodos. Para o CMV avaliou-se sua detecção por sintomatologia e sorologia (ELISA). Inicialmente avaliou-se diferentes protocolos para extração de RNA total de bananeira. Este RNA foi utilizado em RT-PCR. Na indexação para o BSV empregou-se a sintomatologia apresentada, a indexação por método biológico, bem como diferentes *primers* e condições de PCR, utilizando-se amostras de plantas infectadas e sadias. Pela sintomatologia e por ELISA não se detectou o CMV nas matrizes de bananeira. Selecionou-se método para a obtenção de RNA total de bananeira de qualidade. Na indexação das matrizes para o BSV, por teste biológico, detectou-se o vírus em cinco plantas. Avaliou-se nove combinações de *primers* degenerados para o BSV, sendo que, três amplificaram fragmentos nos tamanhos esperados. Apesar dos resultados obtidos, pesquisas futuras são necessárias para a realização de mais ajustes nas reações da PCR para o BSV e posterior indexação de todo o matrizeiro. Para o CMV os métodos testados podem ser utilizados para sua indexação.

**Palavras-chave:** ELISA, teste biológico, RT-PCR, PCR, fitossanidade

## ABSTRACT

### **SANTOS, N. M. Indexing banana to *Cucumber mosaic virus* and *banana streak virus***

Banana is affected by many diseases, such as cucumber mosaic caused by *Cucumber mosaic virus* (CMV) and banana streak caused by *Banana streak virus* (BSV). The control of viruses is mainly based on the use of virus-free seedlings. Therefore, it is important to improvement techniques for indexation. This study aimed to index banana matrices to CMV and BSV by different methods. We evaluated CMV detection by symptoms and serology (ELISA). Protocols for RNA total extraction was tested to obtain quality RNA from banana and then used in RT-PCR. In the case of BSV we evaluated symptomology, biological indexing method and PCR using different primers and PCR conditions with samples from infected and healthy plants. Using symptomology and ELISA we did not detect CMV in banana matrices. It has been possible to obtain a quality total RNA from banana and hence performance of RT-PCR. Indexation of matrices for BSV by biological test detected the virus in five plants. Of the nine combinations of degenerate primers for BSV tested, three amplified specific fragments in the expected sizes. Despite the results obtained here, future research is needed to carry out further adjustments in the PCR reactions for BSV and subsequent indexing of the all matrizeiro for PCR.

**Keywords:** ELISA, bioassay, RT-PCR, PCR, phytossanitary

## INTRODUÇÃO

A banana é uma das frutas mais consumidas no mundo, sendo produzida na maioria dos países tropicais. Em 2009 sua produção mundial chegou a 97 milhões de toneladas, figurando a Índia como o principal país produtor. O Brasil, neste mesmo ano, ocupou o quinto lugar, com uma produção de 6,7 milhões de toneladas e 479.614 hectares de área plantada com bananeira. Filipinas, China e Equador também são importantes produtores da fruta (FAO, 2011).

No Brasil, praticamente toda a produção de banana é consumida in natura e o seu cultivo tem papel fundamental na fixação da mão-de-obra rural. A banana constitui elemento importante na alimentação de populações de baixa renda, não só pelo seu alto valor nutritivo, mas também pelo seu baixo custo. Sabe-se que uma única banana supre cerca de um quarto da quantidade de vitamina C recomendada diariamente para crianças. Contém, ainda, vitaminas A e B, muito potássio, pouco sódio e nenhum colesterol. Além do elevado valor nutritivo, a banana tem alto significado socioeconômico, pois mobiliza um grande contingente de mão-de-obra, permite retorno rápido ao produtor e é geradora de divisas para o país (GANGA, 2002).

De acordo com o IBGE em 2010 a bananicultura representou uma importante atividade agrícola para o Brasil, ocupando uma área cultivada de 491.468 ha, com produção de sete milhões de toneladas. Os maiores problemas do cultivo da bananeira no Brasil são a falta de cultivares produtivas, com resistência às principais pragas e doenças (SILVA et al., 2006).

A bananeira é infectada principalmente pelas seguintes viroses: *Banana bunchy top virus* (BBTV), *Banana bract mosaic virus* (BBrMV), *Cucumber mosaic virus* (CMV) e *Banana streak virus* (BSV). No Brasil ocorrem o CMV e BSV. O CMV produz sintomas de mosaico nas folhas das plantas infectadas e quando ocorrem quedas de temperatura pode ocorrer necrose das folhas. O CMV é transmitido de uma bananeira para outra pelos afídeos, sendo que a principal fonte de vírus não é a bananeira, mas outras plantas hospedeiras como a trapoeraba e hortaliças. Pode ser disseminado a longas distâncias através de mudas infectadas (CORDEIRO et al., 2004).

O BSV possui distribuição cosmopolita. A severidade da infecção causada pelo BSV é bastante variável, dependendo das condições do ambiente, da variedade infectada e da estirpe presente. Este vírus é prejudicial para a bananeira porque afeta o crescimento, a produção e a qualidade dos frutos. Os sintomas mais comuns da infecção pelo BSV são a produção de estrias cloróticas nas folhas que, com o passar do tempo, tornam-se necróticas. A transmissão do vírus pelas cochonilhas é muito eficiente e realizada pelas formas jovens. Os únicos hospedeiros conhecidos deste vírus pertencem à família *Musaceae*. Sua dispersão no campo pode ser realizada pela cochonilha e pelo uso de material infectado (MEISSNER FILHO, 2010).

A indexação permite atestar a sanidade de mudas produzidas em laboratório ou pela multiplicação convencional. Vários métodos podem ser utilizados para esta finalidade, como a inoculação mecânica ou por enxertia de plantas indicadoras, sorologia por ELISA, exame de amostras no microscópio eletrônico ou detecção da presença do DNA/RNA viral por reação em cadeia da polimerase – PCR/RT-PCR (MEISSNER FILHO, 2010). O presente estudo teve como objetivo indexar o matrizeiro de bananeira, localizado no campo experimental do CNPMF, para o CMV e BSV, bem como avaliar a eficiência de alguns métodos em uso no CNPMF para esta finalidade.

## 2.2 MATERIAL E MÉTODO

Os experimentos foram realizados na **Embrapa Mandioca e Fruticultura**, localizada na cidade de Cruz das Almas – BA. Selecionou-se 21 cultivares de bananeira de interesse comercial que foram mantidas em telado no campo experimental da CNPMF para posterior indexação para CMV e BSV (Tabela 4).

Tabela 4. Cultivares de bananeiras provenientes do Banco de Germoplasma e do Programa de melhoramento da Embrapa Mandioca e Fruticultura mantidas no matrizeiro de banana e indexadas para CMV e BSV.

Genótipo	Grupo genômico	Subgrupo	Procedência
Caipira	AAA		Oriunda da África Ocidental, introduzida no Brasil pela Embrapa Mandioca e Fruticultura.
Prata Baby	AAA		Introduzida da Tailândia, avaliada em diversos locais e recomendada no Estado de Santa Catarina pela Empresa Estadual de Pesquisa de Santa Catarina (Epagri).
Grande Naine	AAA	Cavendish	Introduzida pela Embrapa Mandioca e Fruticultura.
Pacovan	AAB	Prata	As bananas do subgrupo prata foram introduzidas no Brasil pelos portugueses.
Thap Maeo	AAB		Introduzida da Tailândia e selecionada pela Embrapa Mandioca e Fruticultura.
Prata Anã	AAB	Prata	As bananeiras do subgrupo prata foram introduzidas no Brasil pelos portugueses. Foi identificada em Criciúma, Santa Catarina
FHIA-02	AAAA	Cavendish	Introduzida de Honduras
Calypso	AAAA	Gros Michel	Originária da Jamaica
Maravilha ou FHIA 01	AAAB	Prata Anã	Introduzido de Honduras, avaliado em vários locais e selecionada, na década de 90, pela Embrapa Mandioca e Fruticultura para a região do Rio Branco (AC)
Prata Graúda	AAAB		Híbrido gerado em Honduras e introduzido no Brasil, na década de 90, pela Embrapa Mandioca e Fruticultura.
Pacovan Ken	AAAB	Prata	Híbrido desenvolvido pela Embrapa Mandioca e Fruticultura em 2001.
Japira	AAAB	Prata	Híbrido desenvolvido pela Embrapa Mandioca e Fruticultura.
Vitória	AAAB		Híbrido desenvolvido pela Embrapa Mandioca e Fruticultura.
Preciosa	AAAB		Híbrido desenvolvido pelo programa de melhoramento genético de banana da Embrapa Mandioca e Fruticultura.
Tropical	AAAB		Híbrido desenvolvido pela Embrapa Mandioca e Fruticultura.
Garantida	AAAB		Híbrido desenvolvido pela Embrapa Mandioca e Fruticultura.
Princesa	AAAB		Híbrido desenvolvido pela Embrapa Tabuleiros Costeiros em parceria com a Mandioca e Fruticultura.
Caprichosa	AAAB		Híbrido desenvolvido pela Embrapa Mandioca e Fruticultura, lançado em 2004.
PA42-44	AAAB		Híbrido desenvolvido pela Embrapa Mandioca e Fruticultura.
FHIA-18	AAAB		Introduzido de Honduras, foi avaliada em vários locais e selecionada pela Embrapa Mandioca e Fruticultura.
FHIA-21	AAAB		Introduzida de Honduras, este híbrido é um plátano tipo francês, que foi desenvolvido em 1987.

Fonte: Tabela elaborada com base em publicações diversas da CNPMF – Cruz das Almas- BA.

### **2.2.1. INOCULAÇÃO MECÂNICA DE CMV EM FUMO**

O isolado do vírus do mosaico do pepino (*Cucumber mosaic virus*, CMV) utilizado nos trabalhos, foi obtido na Embrapa Hortaliças, sendo mantido em casa de vegetação em plantas de fumo (*Nicotiana tabacum* TNN) inoculadas mecanicamente.

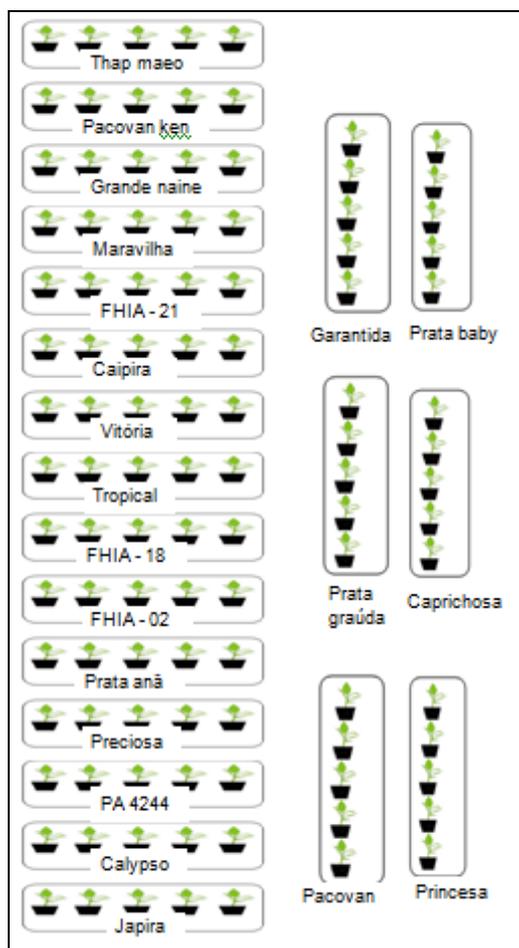
Para a inoculação mecânica do CMV em plantas de fumo (*Nicotiana tabacum* TNN) utilizou-se o tampão fosfato de sódio a 0,02 M, pH 7, contendo sulfito de sódio a 0,02 M. O inóculo obtido de folhas de fumo foi macerado em almofariz esterilizado. Utilizou-se celite como abrasivo e as plantas foram inoculadas com o auxílio do pistilo, logo após a inoculação as folhas foram lavadas com água. As plantas foram monitoradas para observação da expressão dos sintomas. Como não foi possível obter plantas de bananeira infectadas com CMV para serem utilizadas nos trabalhos, plantas de fumo inoculadas mecanicamente com o vírus foram utilizadas como controle positivo para os testes preliminares de extração de RNA total, reações de transcrição reversa (RT) e reação em cadeia da polimerase (PCR).

### **2.2.2 LEVANTAMENTO DE SINTOMAS DO CMV E BSV NO MATRIZEIRO DE BANANA**

As matrizes selecionadas são híbridos, sendo que seis são triplóides e quinze tetraplóides. No telado elas estavam organizadas em blocos com cinco repetições (Figura 5). Inicialmente foram cultivadas em vasos plásticos e posteriormente transferidas para o solo.

Realizou-se o levantamento de sintomas de CMV e BSV nessas matrizes durante oito meses em três leituras que foram feitas nos meses de outubro de 2010, em abril de 2011 e outra em junho de 2011.

Figura 5. Croqui do matrizeiro de banana mantido em telado no campo experimental da CNPMF



### 2.2.3 INDEXAÇÃO PARA O CMV POR ELISA DIRETO

As 21 matrizes de bananeira (Tabela 4) foram avaliadas entre os meses de outubro a novembro de 2010 quanto à presença do CMV por meio de ELISA direto com anti-soros do kit AGDIA SRA 44501/1000 SET CMV, seguindo as orientações do fabricante, disponível no site <http://www.agdia.com>.

Nos testes preliminares utilizando amostras de fumo sadio e infectados avaliou-se duas diluições, 1:5 e 1:10, para maceração das amostras. Com base nestes resultados estabeleceu-se a diluição mais indicada para realização do teste sorológico.

Coletou-se duas amostras foliares de cada planta do matrizeiro de banana. Como controle positivo utilizou-se amostras de fumo infectado por

inoculação mecânica com o CMV e amostras foliares de fumo sadio como controles negativos. Essas plantas eram mantidas em casa de vegetação a prova de insetos e sem controle de temperatura. Para a sensibilização da placa, foi necessário preparar um tampão de cobertura utilizado para diluir o anticorpo de cobertura. Para a preparação do tampão de cobertura foram dissolvidos em 1000 mL de água destilada 1,59 g de carbonato de sódio (anidro) e 2,93 g de bicarbonato de sódio. A solução foi preparada próximo da hora de seu uso e foi armazenada a 4 °C. Em seguida o anticorpo de cobertura foi diluído a 1:200 em tampão de cobertura. Aplicou-se 100 µL de anticorpo em cada orifício da placa e incubou-se em câmara úmida durante uma noite em refrigerador.

Para a preparação de um litro de tampão de lavagem (PBS-T) dissolveu-se em água destilada 8,0 g de cloreto de sódio, 1,15 g fosfato de sódio dibásico, 0,2 g de fosfato de potássio monobásico, 0,2 g cloreto de potássio e 0,5mL de Tween-20. Na manhã seguinte removeu-se o anticorpo de cobertura, se realizou-se duas lavagens com PBS-T.

O tampão de extração das amostras foi preparado diluindo-se 1,3 g de sulfito de sódio anidro, 20 g de polyvinilpirolidona (PVP) MW 24-40.000, 2 g de albumina de ovo, 20 mL de Twen-20 em 1 L de PBS-T. As amostras de fumo utilizadas como controle positivo e negativo, e amostras de bananeira a ser indexada foram maceradas em sacos plásticos com o auxílio de um rolo de madeira e diluídas na proporção 1:5. Coletou-se 100 µL do macerado e aplicou-se em cada orifício da placa, incubando a placa por duas horas a temperatura ambiente em local protegido de luminosidade. Após este tempo, foram realizadas sete lavagens com o tampão de lavagem PBS-T.

. Poucos minutos antes do seu uso foi realizada a diluição do antissoro conjugado A e o conjugado B (SRA 44501) a 1:200 em tampão ECI. O tampão ECI que foi preparado na dissolução de 2 g de albumina de soro bovino (Bovine serum albumin – BSA) e 20 g de PVP em 1 L de PBS-T. Aplicou-se 100 µL do conjugado em cada orifício da placa e novamente incubou-se a placa por duas horas a temperatura ambiente. Repetiu-se o processo de lavagem com o tampão PBS-T, agora por oito vezes.

Finalmente aplicou-se o substrato contendo p-nitrofenilfosfato de sódio na concentração de 1 mg/mL em tampão PNP. O tampão PNP foi obtido

dissolvendo-se 0,1 g de cloreto de magnésio, 97 mL de dietanolamina em 800 mL de água destilada, ajustando-se o pH para 9,8 com ácido clorídrico e completando-se seu volume 1 L com água destilada.

As leituras das reações obtidas foram feitas no aparelho EL<sub>x</sub>800 Universal Microplate Reader (BIO-TEK INSTRUMENTS, INC.) após 45 e 60 minutos da aplicação do substrato (4-pnitrofenilfosfato), utilizando-se filtro de 405 nm. Os resultados obtidos foram comparados com as leituras obtidas nas amostras provenientes de plantas sadias, considerando-se positivas as amostras, cuja leitura foi o dobro da obtida nas amostras de plantas sadias e com absorvância superior a 0,1.

#### **2.2.4 INDEXAÇÃO PARA O CMV POR RT-PCR**

Inicialmente as técnicas para extração de RNA total, transcrição reversa e reação em cadeia da polimerase (PCR) foram ajustadas, utilizando-se amostras foliares de *Nicotiana tabacum* sadias e infectadas com o CMV. Concluídos esses ajustes selecionou-se oito cultivares do matrizeiro de bananeira (Vitória, Pacovan, Prata Baby, Prata Anã, Preciosa, Tropical, FHIA 21 e Pacovan Ken). Seis acessos do BAG de bananeira da CNPMF com sintomas semelhantes ao CMV também foram indexados por RT-PCR.

##### **2.2.4.1 EXTRAÇÃO DE RNA TOTAL**

Todo o material utilizado para a extração do RNA foi autoclavado (ponteiras, béqueres, espátulas) a 121 °C por 20 minutos, já o almofariz e o pistilo foram esterilizados a 180 °C por 4 horas e 30 minutos.

Para a extração de RNA total das amostras foliares de fumo e de bananeira foram testados produtos comerciais a base de tiocianato de guanidina e fenol (Tri Reagente, produzido pela Ludwig Biotecnologia Ltda. e o Brazol, fabricado pela LGC-biotecnologia Ltda.). A extração do RNA total das amostras foi feito a partir de 200 mg de tecido foliar, macerado com nitrogênio líquido, e seguindo as orientações de cada fabricante.

Para a extração de RNA total de bananeira foi testado um protocolo, descrito por Wang et al. (2010). Como controle da extração utilizou-se uma

amostra de fumo infectado e uma de fumo sadio. Seguindo as orientações deste protocolo preparou-se um tampão de extração contendo 4M de isotiocianato de guanidina, 42 mM de citrato de sódio, 0,83% de lauril sarcocinato de sódio, 2,5% de PVP 4000. Para cada amostra foi usado 4,250 µL de tampão de extração. Adicionou-se a este tampão de extração 500 µL de acetato de sódio (2 M) e 250 µL de β-mercaptoetanol.

Cinco gramas de tecido fresco foram maceradas em nitrogênio líquido e cuidadosamente transferidas para tubos de 45 mL contendo tampão de extração. Adicionou-se cinco mL de clorofórmio-isoamílico 24:1 (v/v) ao tubo, agitou-se vigorosamente e incubou-se por cinco minutos no gelo. Em seguida centrifugou-se a 12000 rpm por 15 minutos a 4 °C. Transferiu-se cuidadosamente o sobrenadante para um novo frasco e acrescentou-se igual volume de fenol-clorofórmio-isoamílico 25:24:1. Agitou-se vigorosamente e repetiu-se a centrifugação nas mesmas condições. Coletou-se o sobrenadante e adicionou-se o mesmo volume de isopropanol e incubou-se por 60 minutos a -20 °C. Outra centrifugação foi realizada, nas mesmas condições, descartando o sobrenadante. Realizou-se duas lavagens com etanol a 75%. O sedimento foi dissolvido em 200 µL de água DEPC.

Após a extração, foi verificada a pureza e a concentração do RNA mediante eletroforese em gel de agarose a 1% e medições em espectrofotômetro (GE Healthcare Nano Vue plus).

#### **2.2.4.2 SÍNTESE DE FITA COMPLEMENTAR (cDNA)**

Nas reações de transcrição reversa (RT) utilizou-se a transcriptase Moloney Murine Leukemia Virus (M-MLV). Testou-se diferentes quantidades de RNA 2,0, 4,0, 6,0, 10,0 e 20,0 µg e estabeleceu-se a melhor quantidade para realizar a síntese de cDNA para cada um dos kits utilizados.

Como não foi possível obter uma amostra de bananeira infectada com CMV, na RT-PCR utilizou-se *primer* específico para o gênero *Musa*, denominado Musa 25 S rRNA com as seguintes sequências 5' GTA AAC GGC GGG AGT CAC TA 3' (*Forward*) e 5' TCC CTT TGG TCT GTC GTT TG 3' (*Reverse*) identificado por Van den Berg et al. (2006), que produz uma banda de 106 pares de base.

Para as reações, utilizando o kit de transcriptase da Invitrogen empregou-se 3,0 µL de RNA (~ 6 µg), 1,0 µL de *primer* CMV-R (10 mM) e 7,0 µL de água DEPC. Após homogeneização, incubou-se a reação a 65°C por 5 minutos no termociclador Applied Biosystems Veriti™ 96 Well – Thermal Cycler e em seguida transferiu-se imediatamente para o gelo. Acrescentou-se 4,0 µL de tampão da reação (Buffer 5X- 250 mM Tris-HCl, 375 mM KCl, 15 mM MgCl<sub>2</sub> e 0,1 M DTT), 2,0 µL de DTT (0,1M), 1,0 µL de dNTP (10 mM), 1,0 µL de água DEPC e 1,0 µL de M-MLV (200 U/ µL- Invitrogen). Incubou-se esta reação por 50 minutos a 37°C seguido de 15 minutos a 70°C, finalizando a 4°C.

Para cada reação utilizando o kit da Promega foi adicionado 1,0 µL de RNA (~2 µg), 1,0 µL de *primer* CMV-R (10 mM), e 13 µL de água DEPC totalizando 15 µL para esta reação inicial. Incubou-se em termociclador a 65°C por 5 minutos. Retirou-se do termociclador e colocou-se imediatamente no gelo. Em seguida acrescentou-se 5 µL de tampão da reação (Buffer 5X – 50mM Tris-HCl, 75 mM KCl, 3 mM MgCl<sub>2</sub> e 10 mM DTT), 1,25 µL de dNTP (10 mM), 2,75 µL de água DEPC e 1,0 µL de M-MLV (200U/µL) totalizando 10 µL. Incubou-se agora por 60 minutos a 65 °C, seguido de 15 minutos a 70 °C finalizando com uma temperatura de 4 °C.

Já para o kit da New England Bio Labs (NEB) empregou-se 1,0 µL de RNA (~2 µg), 1,0 µL de *primer* CMV-R (10 mM), e 18,75 µL de água DEPC totalizando 20,25 µL. Levou-se ao termociclador Applied Biosystems Veriti™ 96 Well – Thermal Cycler para incubar a 65°C por 5 minutos. Retirou-se do termociclador e colocou-se imediatamente no gelo. Em seguida acrescentou-se 2,5 µL de tampão da reação (Buffer 10X- 50 mM Tris-HCl, 75 mM KCl, 3 mM MgCl<sub>2</sub> e 10 mM DTT), 1,25 µL de dNTP (10 mM), e 1,0 µL de M-MLV (200 U/µL) totalizando 4,75 µL e incubou-se por 60 minutos a 65 °C, seguido de 15 minutos a 70 °C finalizando com uma temperatura de 4 °C.

Apenas as amostras de fumo foram utilizadas para os testes com transcriptase Moloney Murine Leukemia Virus (M-MLV) fornecidas pela Invitrogen, Promega e New England Bio Labs. Para as amostras de bananeira foram realizadas reações apenas com kit da Invitrogen.

### 2.2.4.3 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE – PCR

Utilizou-se para a realização do PCR sequências de *primers* da capa protéica de ambos os subgrupos do CMV, disponíveis no trabalho de Hu et al. (1995). Os *primers*, denominados CMV1 *Forward* (5' CAT CGA CCA TGG ACA AAT CTG AAT CAA C 3') e CMV2 *Reverse* (5' CTC TCC ATG GCG TTT AGT GAC TTC AGC AG 3') amplificam uma banda de aproximadamente 745 pb.

Um PCR gradiente foi realizado variando-se a temperatura de anelamento de 50°C a 65°C, utilizando os *primers* CMV1 e CMV2, estabelecendo-se como 58 °C a melhor temperatura de anelamento do *primer*.

Outro *primer* denominado CMV-Fboa (5' TAT GAT TAA GAA RCT TGT TTC GCG 3' e CMV-Rboa (5' GCC GTA AGC TGG ATG GAC AA 3') sintetizados com base na comparação de sequências de oito isolados do vírus descritos por WYLIE et al. (1993) foi testado. Esses oligonucleotídeos permitem a síntese de um fragmento de 488 pb para o CMV-I e de 500 pb para o CMV-II. Esse fragmento inclui dois terços do gene da proteína capsial (correspondendo ao terminal 3') e parte da região 3' não traduzida (BOARI, 1998). Testou-se diferentes concentrações do *primer* (0,3, 0,4 e 0,6 mM) por reação.

As condições para a PCR constaram de uma desnaturação inicial a 94 °C por 3 minutos, seguida de 35 ciclos a 94 °C por 45 segundos, 58 °C por 30 segundos e 72 °C por 2 minutos, com uma extensão final de 10 minutos a 72 °C, finalizando a 4 °C. Os fragmentos de DNA amplificados foram visualizados em gel de agarose a 1% corado com brometo de etídeo sob luz ultravioleta em fotodocumentador da via Gel Logic 200 – Imaging system).

### 2.2.5 INDEXAÇÃO DE BANANA PARA O BSV POR TESTE BIOLÓGICO

Como plantas teste foram utilizadas mudas de bananeira Caipira sadias, micropropagadas pela CAMPO (Cia. de Produção Agrícola), localizada na área da Embrapa Mandioca e Fruticultura em Cruz das Almas - BA. Após a etapa de enraizamento *in vitro*, as mudas foram aclimatizadas em tubetes durante 30 dias em estufa. Após isso, as plantas foram transplantadas para sacos de polietileno de 30 x 15 cm com capacidade para 2,5 litros, contendo solo

adubado, e cultivadas em casa de vegetação sem controle de temperatura e umidade (Figura 6).

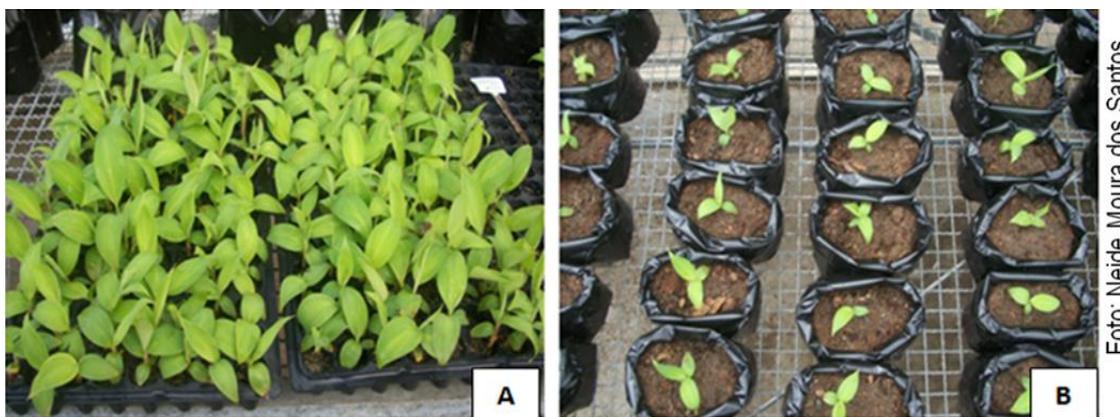


Figura 6. A) Mudás de bananeira Caipira após 30 dias na estufa para o processo de pré aclimação. B) Mudás de bananeira após o transplante para os sacos de polietileno.

Para as 21 matrizes em avaliação (tabela 4), utilizou-se três plantas teste. Como testemunha usou-se três plântulas que não foram infestadas com cochonilhas e três infestadas com cochonilhas não virulíferas (vindas diretamente da colônia). Para o controle positivo foram utilizadas três plantas infestadas com cochonilhas que foram alimentadas em folhas de Mysore com e sem sintomas de BSV. Foram utilizados ainda mais dois controles positivos infestados com cochonilhas alimentadas em folhas das variedades Perak e Madu, pertencente ao BAG de banana e cuja infecção com o BSV foi detectada por testes biológicos realizados anteriormente por Silveira et al. (2008).

Nesses ensaios foram utilizados ínstares jovens da cochonilha *Planococcus citri* criadas em abóbora (*Cucurbita maxima* L.), cultivar cabotchá, no insetário da Embrapa Mandioca e Fruticultura. Com o auxílio de pincel e uma luminária aproximadamente dez ínstares jovens da cochonilha foram transferidos da abóbora para amostras de tecidos foliares das bananeiras a serem testadas e colocadas em placas de Petri, onde permaneceram por 24 horas para o acesso de aquisição (Figura 7). Esse método foi realizado com base em trabalhos desenvolvidos por Silveira (2001).

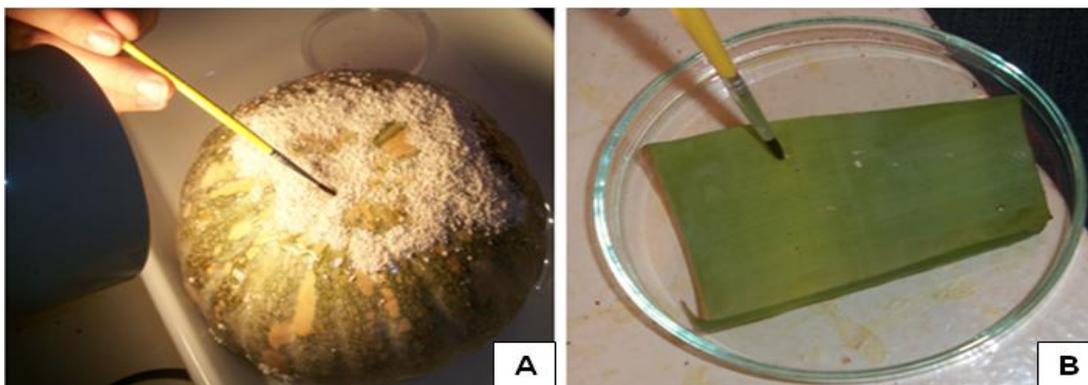


Foto: Neide Moura dos Santos

Figura 7. A) Cochonilhas *P. citri* criadas em abóbora (*Curcubita máxima* L.) no insetário do CNPMF. B) Cochonilhas sendo transferidas da abóbora para amostras foliares para o acesso de aquisição.

Algumas cochonilhas, após passarem 24 horas para o período de aquisição em amostras foliares de Mysore (controle positivo) foram transferidas imediatamente para as plantas testes para o acesso de transmissão. Outras cochonilhas foram mantidas em placas de Petri sem contato com lâmina foliar infectada por mais 24h, 36h, 48h e 72h para depois serem transferidas para a transmissão, respectivamente. Esta observação teve como objetivo avaliar por quanto tempo a cochonilha permanecia virulífera.

As mudas de bananeira Caipira, 40 a 60 dias após a aclimatização, medindo entre 12 cm e 20 cm de altura e com quatro a seis folhas, foram infestadas com *P. citri*. Os tecidos foliares juntamente com as cochonilhas foram transferidos para as plantas teste e presas nas mesmas com o auxílio de fita crepe. A seguir essas plantas foram cobertas com campânulas individuais, preparadas com garrafas PET com uma janela lateral telada (Figura 8).



Foto: Neide Moura dos Santos

Figura 8. A) Tecidos foliares juntamente com as cochonilhas sendo transferidos para as plantas teste. B) Plantas sendo cobertas com campânulas individuais.

Para a confecção das campânulas foram utilizadas garrafas PET de 2,0 L, tela de nylon, lixa, adesivo de contato, a base de borracha sintética e solventes orgânicos (Cascola Extra sem Toluol) e estilete. As garrafas PET foram cortadas ao meio com o auxílio do estilete, em cada uma das partes foi feito uma abertura lateral, posteriormente coberta com um pedaço de tela.

As cochonilhas permaneceram 48 horas nas mudas de banana Caipira protegidas pela campânula, para realização do acesso de transmissão, e depois foram mortas com a pulverização de Diazinon 600 CE 10 mL/10 litros. Diazinon ou diazinona é um inseticida e acaricida organofosforado, classe toxicológica II (altamente tóxico), com autorização de uso no Brasil como: domissanitário, agrotóxico de uso agrícola, na jardinagem amadora e produto veterinário para o controle de ectoparasitas em gados, carneiros e animais domésticos. O produto está disponível no mercado na forma de pó, concentrado emulsionável, líquido ou granulado. As plantas foram avaliadas semanalmente quanto a presença de sintomas até 60 dias após a inoculação.

### 2.2.6 INDEXAÇÃO DE BANANEIRA PARA O BSV POR PCR

Para indexação por PCR selecionou-se nove acessos do BAG de bananeira da Embrapa Mandioca e Fruticultura com resultados positivos na indexação biológica para o BSV realizado por Silveira et al. (2006) (Tabela 5).

Tabela 5. Acessos selecionados do BAG de bananeira da Embrapa Mandioca e Fruticultura com resultados positivos na indexação biológica para o BSV para indexação por PCR

Amostra	Acesso	Grupo genômico
1	Madu	AA
2	BB-IAC	BB
3	Muga	AAA
4	Who Gru	AAA
5	Mysore	AAB
6	Pulut	AAB
7	Platina	AAAB
8	Teparod	ABBB
9	Nemwa Daeng	ABB

Acessos de diferentes grupos genômicos foram selecionados para avaliar alguns *primers* descritos na literatura para a detecção do BSV em nossas condições. Como controle negativo utilizou-se amostras foliares de bananeira Caipira (AAA) micropropagada pela Campo e mantidas em casa de vegetação.

### 2.2.6.1 EXTRAÇÃO DE DNA

O DNA genômico das plantas de bananeira em análise (Tabela 5) e mais o controle negativo (Cultivar Caipira) foram isolados de acordo com o protocolo descrito por Doyle & Doyle (1987) com algumas modificações. Foram utilizadas amostras de folhas jovens de cada genótipo em análise. As lâminas foliares foram coletadas e mantidas em gelo no campo. Antes de serem maceradas as amostras foram lavadas em água corrente com detergente. Em seguida foram maceradas em almofariz de porcelana, contendo nitrogênio líquido, até a obtenção de um pó fino. Aproximadamente 300 mg de material macerado foi transferido para microtubos de 2,0 mL.

Posteriormente, foi adicionado 1 mL de tampão de extração (Tabela 6). Os microtubos foram agitados no vórtex e incubados em banho-maria a 65°C por 45 minutos (homogeneizados a cada 15 minutos). Os tubos foram retirados do banho-maria e acrescentou-se 700 µL de clorofórmio: álcool Isoamílico (24:1), homogeneizou-se suavemente e centrifugou-se por 10 minutos a 10.000 rpm.

Tabela. Tampão de Extração de DNA (Doyle & Doyle, 1987)

SOLUÇÕES/REAGENTES/	CONCENTRAÇÃO FINAL
CTAB a 10%	2,0%
NaCl a 5 M	1,4 M
Tris HCl a 1 M pH 8,0	0,1 M
EDTA a 0,5 M	20,0 mM
2- mercaptoetanol	0,8%
PVP (Polivinilpirrolidona)	2,0%
H <sub>2</sub> O de mili-Q	

Coletou-se o sobrenadante para novos tubos de 1,5 mL e adicionou-se isopropanol, equivalente a 2/3 do volume coletado. Incubou-se a - 20°C por cinco minutos, sendo os tubos novamente centrifugados nas mesmas

condições e descartou-se o sobrenadante. Adicionou-se 600 µL de tampão TE (Tris- HCl 10 mM, pH 8,0 + EDTA 1 mM) e incubou-se por 1 hora e 30 minutos na geladeira.

Em seguida adicionou-se 200 µL de acetato de amônio a 7,5 M. Fechou-se o microtubo, misturou-se suavemente por inversão para homogeneizar a solução e novamente incubou-se na geladeira por 15 minutos. Depois centrifugou-se por 15 minutos a 8000 rpm e transferiu-se o sobrenadante para um novo microtubo de 1,5 mL e adicionou-se 800 µL de etanol absoluto misturando suavemente por inversão. Incubou-se por uma hora a -20°C, centrifugou-se por 10 minutos a 14000 rpm. Descartou-se o sobrenadante e realizou-se duas lavagens com 500 µL de etanol 70% para eliminar os resíduos de sais presentes no DNA.

Repetiu-se a centrifugação descartando o sobrenadante. O precipitado foi lavado duas vezes com 500 µL de etanol 70%. As amostras de DNA foram deixadas à temperatura ambiente por 20 minutos para secagem e então ressuspensas em 100 µL de TE (Tris- HCl 10 mM, pH 8,0 + EDTA 1 mM) + 2 µL de ribonuclease (RNase 10 mg/mL).

Após a extração, foi verificada a pureza e a concentração do DNA mediante eletroforese em gel de agarose a 1,5% e medições em espectrofotômetro (GE Healthcare Nano Vue plus). Armazenou-se o DNA a -20°C.

#### **2.2.6.2 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE – PCR**

As nove combinações de *primers* testadas foram: BADNA1A/MYS3' (~400/600pb), BADNA1A/BADNA4 (~400/600pb), BADNA1A/BADNA3 (~1840pb), BADNA2/BADNA4 (~600pb), BADNA2/MYS3 (~450pb), SCBVVF5/BADNA3 (~1800pb), SCBVVF5/BADNA4 (~550pb), SCBVVF5/SCBVVR5 (~220pb), e BADNAT/BADNA3 (~1200pb). As sequências de cada um deles e suas respectivas origens estão apresentadas na tabela 7.

Foram realizados testes preliminares utilizando as nove amostras positivas e a amostra sadia utilizando diferentes concentrações de DNA (7,5

ng, 10 ng, 12,5 ng, 25 ng, 37,5 ng e 50 ng) e de *primer* (0,2  $\mu$ M, 0,3  $\mu$ M, 0,35  $\mu$ M e 0,4  $\mu$ M) na reação da PCR.

Estabeleceu-se uma reação padrão da PCR para todas as combinações de *primers* (Tabela 8), a serem avaliadas. Considerando a temperatura de anelamento de cada um dos *primers* foram estabelecidas as melhores combinações a serem utilizadas.

Tabela 7. Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para a amplificação dos genes estudados de BSV

<i>Primer</i>	Sequência do <i>primer</i>	Referência
<b>BADNA1A</b> <sup>1</sup>	5' CTN TAY GAR TGG YTN GTN ATG CCN 3'	Harper et al. (2002)
<b>BADNA2</b> <sup>1</sup>	5' TAY ATH GAY GAY ATH YT 3'	Ahlawat et al. (1996)
<b>BADNA3</b> <sup>2</sup>	5' TAA CTT TGC CTA CCG ACA TAC C 3'	Wetzel (1992)
<b>BADNA4</b> <sup>2</sup>	5' TCC AYT TRC ANA YNS CYC CCC ANC C 3'	Harper et al. (2002)
<b>MYS3</b> <sup>2</sup>	5' CCC CAT RCA NCC RTC NGT YTC 3'	Ahlawat et al. (1996)
<b>SCBVF5</b> <sup>1</sup>	5' TCA AAG TTT GAT TTG AAG AGC GGG 3'	Braithwaite et al. (1995)
<b>SCBVVR5</b> <sup>2</sup>	5' CTC CGA GAA AAC CAA TAT GTC ATC 3'	Braithwaite et al. (1995)
<b>BADNAT</b> <sup>1</sup>	5' CCC GGG MYM WNG CTC TGA TAC CA 3'	Wetzel (1992)

<sup>1</sup>- *Forward*

<sup>2</sup>- *Reverse*

Tabela 8. Componentes básicos da reação para a preparação do coquetel para realização do PCR

REAGENTES	CONCENTRAÇÃO FINAL	UMA REAÇÃO
Água Mili-Q		9,0 $\mu$ L
dNTP	0,2 mM	1,2 $\mu$ L
Tampão 10X	1 X	1,5 $\mu$ L
MgCl <sub>2</sub> 25 mM	1,5 mM	0,9 $\mu$ L
Taq (5U/ $\mu$ L)	1,0 U	0,2 $\mu$ L
<i>Primer</i> F (10 $\mu$ M)	0,4 $\mu$ M	0,6 $\mu$ L
<i>Primer</i> R (10 $\mu$ M)	0,4 $\mu$ M	0,6 $\mu$ L
DNA 5 ng/ $\mu$ L	7,5 ng	1,5 $\mu$ L

A seguir, são apresentados os ciclos utilizados para cada uma das combinações. Para algumas reações foram necessárias testar mais de uma temperatura de anelamento.

## Condições da PCR usadas para a combinação BADNA1A/MYS3

94°C ..... 3 min.  
 94°C ..... 0,45 seg. }  
 50°C ..... 0,30 seg. } 4X  
 72°C ..... 0,45 seg. }

94°C ..... 0,45 seg. }  
 55°C ..... 0,30 seg. } 30X  
 72°C ..... 0,45 seg. }  
 72°C ..... 5 min.  
 8°C

## Condições da PCR usadas para a combinação BADNA1A/MYS3

94°C ..... 3 min.  
 94°C ..... 0,45 seg. }  
 37°C ..... 0,30 seg. } 5X  
 72°C ..... 0,45 seg. }

94°C ..... 0,45 seg. }  
 53°/54°C..... 0,30 seg. } 30X  
 72°C ..... 0,45 seg. }  
 72°C ..... 5 min.  
 8°C

## Condições da PCR usadas para a combinação BADNA1A/BADNA4

94°C ..... 3 min.  
 94°C ..... 0,45 seg. }  
 47°C ..... 0,30 seg. } 5X  
 72°C ..... 0,45 seg. }

94°C ..... 0,45 seg. }  
 55°/57°C ..... 0,30 seg. } 30X  
 72°C ..... 0,45 seg. }  
 72°C ..... 5 min.  
 8° C

## Condições da PCR usadas para a combinação BADNA1A/BADNA3

94°C ..... 3 min.  
 94°C ..... 0,45 seg. }  
 45°C ..... 0,30 seg. } 5X  
 72°C ..... 0,45 seg. }

94°C..... 0,45 seg. }  
 48°/50°C..... 0,30 seg. } 30X  
 72°C ..... 0,45 seg. }  
 72°C ..... 5 min.  
 8°C

## Condições da PCR usadas para a combinação BADNA2/BADNA4

94°C ..... 3 min.  
 94°C ..... 0,45 seg. }  
 39°/37°C..... 0,30 seg. } 14X  
 72°C ..... 0,45 seg. }

94°C..... 0,45 seg. }  
 57°/55°C..... 0,30 seg. } 20X  
 72°C ..... 0,45 seg. }  
 72°C ..... 5 min.  
 8°C

## Condições da PCR usadas para a combinação BADNA2/MYS3

94°C ..... 3 min.  
 94°C ..... 0,45 seg.. }  
 37°/40°C..... 0,30 seg. } 5X  
 72°C ..... 0,45 seg. }

94°C ..... 0,45 seg. }  
 55°/54°C..... 0,30 seg. } 30X  
 72°C..... 0,45 seg. }  
 72°C ..... 5 min.  
 8°C

## Condições da PCR usadas para a combinação SCBVVF5/BADNA3

94°C ..... 3 min.  
 94°C ..... 0,45 seg. }  
 55°/53°C..... 0,30 seg. } 17X  
 72°C..... 0,45 seg. }

94°C ..... 0,45 seg. }  
 49°/47°C..... 0,30 seg. } 17X  
 72°C ..... 0,45 seg. }  
 72°C ..... 5 min.  
 8° C

## Condições da PCR usadas para a combinação SCBVVF5/BADNA4

94°C ..... 3 min.  
 94°C ..... 0,45 seg. }  
 55°/56°C..... 0,30 seg. } 17X  
 72°C ..... 0,45 seg. }

94°C ..... 0,45 seg.. }  
 58°/59°C..... 0,30 seg. } 17X  
 72°C ..... 0,45 seg. }  
 72°C..... 5 min.  
 8°C

## Condições da PCR usadas para a combinação SCBVVF5/SCBVVR5

94°C ..... 3 min.  
94°C ..... 0,45 seg. }  
55°C ..... 0,30 seg.. } 17X  
72°C ..... 0,45 seg. }

94°C ..... 0,45 seg. }  
50°C ..... 0,30 seg. } 17X  
72°C ..... 0,45 seg. }  
72°C ..... 5 min.  
8°C

## Condições da PCR usadas para a combinação BADNAT/BADNA3.

94°C ..... 3 min.  
94°C ..... 0,45 seg. }  
57°C ..... 0,30 seg. } 5X  
72°C ..... 0,45 seg. }

94°C ..... 0,45 seg. }  
49°/51°C..... 0,30 seg. } 30X  
72°C ..... 0,45 seg. }  
72°C ..... 5 min.  
8°C

Os produtos amplificados foram analisados por meio de eletroforese em gel de agarose a 1,5% e visualizados após coloração por brometo de etídio no fotodocumentador da via Gel Logic 200 – Imaging system).

## 2.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 2.3.1 INOCULAÇÃO MECÂNICA DE CMV EM FUMO

Quando plantas de fumo foram inoculadas mecanicamente com o CMV, os sintomas da infecção foram observados, em todas as repetições, após sete dias (Figura 9). Essas plantas foram mantidas em casa de vegetação e posteriormente testadas e usadas como controles positivos nos testes de RT-PCR e ELISA.



Figura 9. Fumo com sintoma causado pelo CMV.

### 2.3.2 LEVANTAMENTO DOS SINTOMAS DO CMV E BSV NO MATRIZEIRO DE BANANEIRA

No levantamento visual do matrizeiro de bananeira realizado em três épocas diferentes (outubro de 2010, abril de 2011 e junho de 2011) foi observado quatro matrizes apresentando sintomas semelhante aos causados pelo BSV (Tabela 9). Contudo, os sintomas não foram observados em todas as repetições. Não detectou-se sintomas semelhantes aos ocasionados pelo CMV em nenhuma das plantas matrizes.

Para Jones & Lockhart (1993) o diagnóstico baseado apenas em sintomas foliares não deve ser o único método usado para a indexação devido a natureza esporádica da expressão do sintoma do BSV ao longo do ano, podendo estar totalmente ausentes ou leves a ponto de não serem

identificados a depender das condições ambientais (temperatura e duração do dia) e das características do hospedeiro.

Tabela 9. Matrizes de bananeira com sintomas de BSV após leituras visuais realizadas em três períodos diferentes.

Genótipo	Leitura 1 out./2010	Leitura 2 abr./2011	Leitura 3 jun./2011
Caipira			
Prata Baby			
Grande Naine			
Pacovan			
Thap Maeo			
Prata Anã		X	
FHIA-02			
Calypso			
Maravilha			
Prata Graúda			
Pacovan Ken			
Japira			
Vitória		X	
Preciosa			
Tropical			
Garantida			X
Princesa			
Caprichosa			
PA42-44			
FHIA-18			
FHIA-21			X

X = matrizes com sintomas semelhantes do BSV

### 2.3.3. INDEXAÇÃO PARA O CMV POR ELISA DIRETO

Em testes preliminares avaliou-se duas diluições para maceração das amostras de fumo infectadas com CMV, observando-se que a diluição a 1:5 apresentou melhores resultados nos testes realizados. Quando as amostras foram maceradas na diluição de 1:5 a absorvância média obtida no ELISA foi de 0,561, enquanto que na diluição de 1:10 a absorvância média foi de 0,343.

Amostras foliares das 21 matrizes de banana, com duas repetições cada uma, foram avaliadas por ELISA direto para CMV não sendo detectada a presença do vírus em nenhuma dessas amostras (Tabela 10). Resultados semelhantes foram obtidos por Silveira et al. (2004) na indexação biológica e

sorológica por ELISA dos acessos do BAG de banana da Embrapa Mandioca e Fruticultura. Em todas as amostras de fumo infectadas com CMV e utilizadas como controle positivo foi possível confirmar a presença do vírus pelo ELISA.

Tabela 10. Resultado da indexação das matrizes de bananeira para CMV utilizando o ELISA direto

Genótipo	Leitura após 60 min.
Caipira	0,003
Prata Baby	0,013
Grande Naine	0,011
Pacovan	0,000
Thap Maeo	0,000
Prata Anã	0,004
FHIA-02	0,008
Calypso	0,005
Maravilha	0,015
Prata Graúda	0,020
Pacovan Ken	0,008
Japira	0,001
Vitória	0,000
Preciosa	0,001
Tropical	0,048
Garantida	0,002
Princesa	0,036
Caprichosa	0,010
PA42-44	0,001
FHIA-18	0,006
FHIA-21	0,006
Fumo infectado	0,311
Fumo sadio	0,004

Em trabalhos realizados por Hu et al. (1995), bananeiras com sintomas severos do CMV provenientes de Oahu apresentaram resultado negativo em ELISA e positivo em *Dot blot* e RT-PCR. Já as amostras de bananeiras infectadas por CMV provenientes do Havaí deram o resultado positivo para o ELISA quando utilizou-se a diluição 1:100. Estes resultados foram atribuídos a cultivar e não a estirpe do vírus. Colariccio et al. (1996) detectaram o CMV utilizando ELISA e *Western blot* direto de folhas de bananeira infectada.

Eiras et al. (2001) conseguiram com o DAS-ELISA detectar a presença do CMV em *N. glutinosa* previamente inoculada mecanicamente com o vírus,

usando kit de antissoros da AGDIA específicos para os subgrupos CMV I e II. Em 2004, Furuya et al., detectaram a presença do CMV em bananeiras da região da Indonésia. Os avanços e aperfeiçoamento das técnicas e dos produtos utilizados na indexação de viroses vêm permitindo cada vez mais o seu uso.

### 2.3.4. INDEXAÇÃO PARA O CMV POR RT-PCR

#### 2.3.4.1 EXTRAÇÃO DE RNA TOTAL

A partir da quantificação em espectrofotômetro e análise qualitativa em gel de agarose a 1% (Figura 10a), verificou-se que foi possível extrair RNA total de fumo usando os produtos comerciais disponíveis no laboratório de virologia da CNPMF. Obteve-se um RNA total de fumo de melhor qualidade quando se utilizou o protocolo de extração descrito por Wang et al. (2010) (Figura 10b).

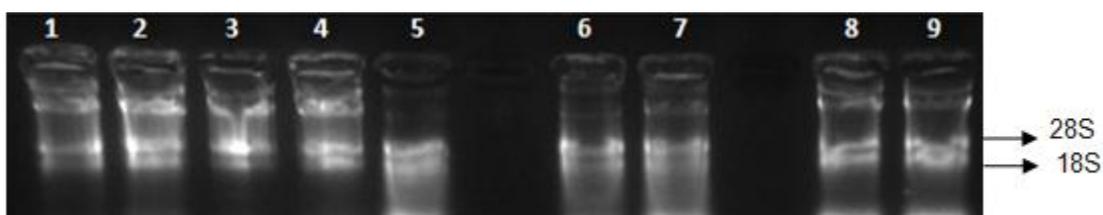


Figura 10a. Eletroforese em gel de agarose a 1% de RNA total de fumo extraído utilizando o Tri Reagente. 1-5 - amostras de fumo infectado; 6-9 - amostras de fumo sadio.

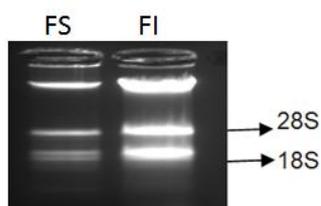


Figura 10b. Eletroforese em gel de agarose a 1% de RNA total de fumo extraído seguindo protocolo proposto por Wang et al. (2010). FS – fumo sadio e FI – fumo infectado

Foi extraído o RNA total de oito cultivares do matrizeiro de bananeira (Vitória, Pacovan, Prata Baby, Prata Anã, Preciosa, Tropical, FHIA 21 e Pacovan Ken) e seis acessos do BAG de bananeira do CNPMF que apresentavam sintomas semelhantes ao CMV. Sendo que, em nenhum destes

acessos do BAG, foi confirmada a presença do CMV nas condições em que foram avaliados no laboratório de virologia do CNPMF. A análise qualitativa da extração de RNA total de bananeira, em gel de agarose a 1%, mostrou as bandas 28S e 18S indicando a obtenção de RNA de qualidade quando se utilizou o protocolo proposto por Wang et al. (2010) (Figura 11). Não se obteve RNA total de qualidade de bananeira quando foram utilizados os produtos comerciais disponíveis no laboratório (Tri Reagente e Brazol).

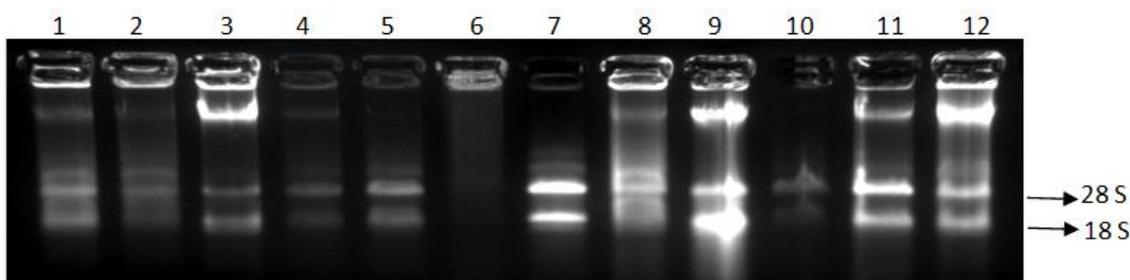


Figura 11. Eletroforese em gel de agarose a 1% de RNA total de bananeira extraído seguindo protocolo proposto por Wang et al. (2010). 1 a 6 - amostras de bananeira do BAG. 7- Prata Baby; 8 - Prata Anã; 9 - Preciosa; 10 - Tropical; 11- FHIA 21; 12- Pacovan Ken.

De acordo com Wang et al. (2005) não foi possível extrair RNA de qualidade de amostras foliares de *Ginkgo biloba* usando os produtos comumente utilizados para esta finalidade, como o Trizol. Para solucionar este problema foi avaliado um tampão semelhante ao utilizado nos experimentos aqui apresentados. Para Wang et al. (2004) a alta concentração de  $\beta$ -mercaptoetanol usado serviu para inibir a ação de RNAses assim como reduziu a oxidação dos compostos fenólicos e das ligações destes compostos com ácidos nucleicos, o que poderia causar danos irreversíveis ao RNA.

Trabalho semelhante foi desenvolvido por Fang et al. (1992), onde o aumento de concentração de sais no tampão de extração reduziu a interferência dos polissacarídeos, aumentou a solubilidade e reduziu a co-precipitação destes compostos com o DNA nas etapas finais da extração.

Xu et al. (2006) trabalhando com uma fruta chinesa (*Rosa roxburghii Tratt*) que é uma planta rica em polifenóis, carboidratos e outros metabólitos secundários, características semelhantes as encontradas em bananeira, obtiveram resultados satisfatórios quando usaram tampão de extração com composição semelhante aos usados neste experimento. Ainda segundo esses

autores altas concentrações dos antioxidantes PVP e  $\beta$ -mercaptoetanol preveniram a oxidação fenólica e a formação de complexos fenólicos. Reduzindo a oxidação fenólica e impedindo as ligações covalentes destes compostos com os ácidos nucleicos garantimos a qualidade do RNA extraído. Porebski et al. (1997) também observou que compostos fenólicos podem se ligar covalentemente aos ácidos nucleicos reduzindo a qualidade e quantidades de DNA disponível após a extração.

#### **2.3.4.2 SÍNTESE DE FITA COMPLEMENTAR – CDNA**

Obteve-se resultados satisfatórios com todos os kits de transcriptase testados (Invitrogen, Promega e New England Bio Labs), todavia os testes demonstraram que a concentração de RNA pode influenciar na qualidade da reação. Em todas as reações de transcrição reversa realizadas com o RNA total extraído de fumo sadio e infectado foi possível obter os resultados esperados na PCR. Para as amostras de bananeira apenas as reações utilizando extrações de RNA totais com base no protocolo proposto por Wang et al. (2010) levaram a resultados satisfatórios na PCR. O sucesso desta etapa parece ser devido a extração de RNA de qualidade.

#### **2.3.4.3 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE – PCR PARA CMV**

Foi possível amplificar fragmentos do CMV, com os *primers* testados para as amostras de fumo sempre que a extração de RNA total possuía boa qualidade. Para todas as temperaturas de anelamento testadas no PCR-Gradiente, usando amostras provenientes de fumo infectado, houve amplificação de fragmentos do genoma viral no tamanho esperado (745 pb), enquanto nas amostras de plantas sadias não se detectou nenhuma banda (Figura 12).

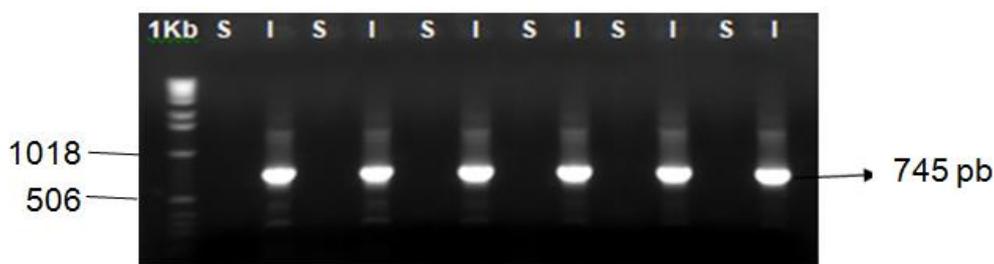


Figura12. PCR gradiente com temperaturas variando de 50°C a 65°C utilizando *primer* CMV1 e CMV2, descrito por Hu et al. (1995). 1Kb – marcador de peso molecular – DNA Ladder. S – amostra de fumo sadio. I – amostra de fumo infectado com CMV.

Para as amostras de bananeira a eficiência da reação foi confirmada pela amplificação do controle interno específico para o gênero *Musa* (*Musa* 25 S rRNA), conforme descrito por Santos (2010), pois não havia disponível nenhuma amostra de bananeira infectada com o vírus (Figura 13).

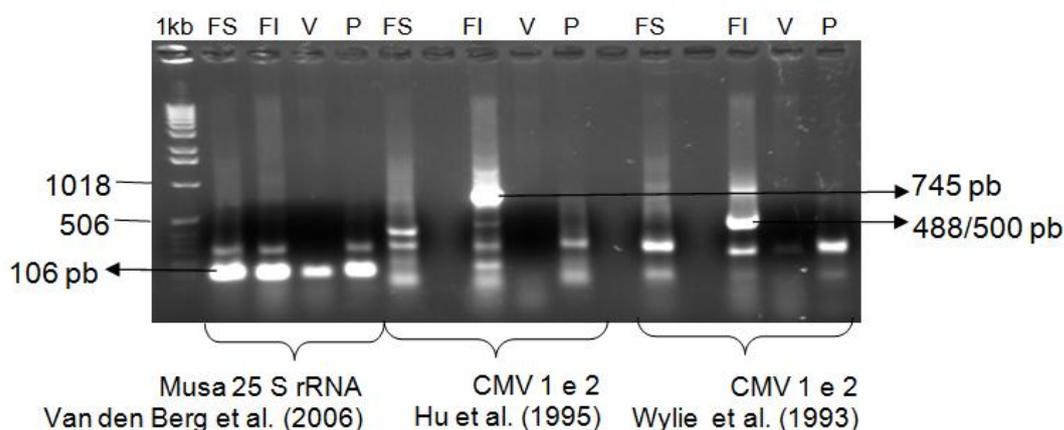


Figura 13. PCR para CMV utilizando o *primer* de controle interno Musa 25 S rRNA, e dois pares de *primer* para o CMV, conforme Hu et al. (1995) *primer* CMV 1 e 2, assim como os *primers* descritos por Boari (1998). 1kb- marcador de peso molecular-DNA Ladder; FS- fumo sadio; FI- fumo infectado; V- amostra de bananeira Vitória e P- amostra de bananeira Pacovan.

Eiras et al. (2000) utilizando RT-PCR e oligonucleotídeos para região 3' da capa protéica do CMV conseguiram amplificar um fragmento com 486 pb em amostras de fumo (*Nicotiana glutinosa*) inoculadas com um isolado do CMV obtido de bananeira proveniente do município de Miracatu – SP.

### 2.3.5. INDEXAÇÃO DE BANANEIRAS PARA O BSV POR TESTE BIOLÓGICO

O método biológico permitiu a detecção do BSV em sete plantas das 21 matrizes de bananeira avaliadas (Tabela 12). Os primeiros sintomas (estrias cloróticas iniciando da nervura principal) foram observados aos trinta e cinco dias após a inoculação, geralmente em apenas uma das plantas teste. Para as três cultivares usadas como controle positivo, duas deram resultado positivo no teste realizado. Nas plantas utilizadas como testemunhas no teste, sem cochonilhas e com cochonilhas não virulíferas, não se detectou sintomas de BSV.

Tabela 12. Resultado da indexação de 21 matrizes de bananeira por método biológico para o BSV

Genótipo	35 dias após a inoculação	45 dias após a inoculação	60 dias após a inoculação	100 dias após a inoculação
Caipira			X	
Prata Baby				
Grande Naine				
Pacovan				
Thap Maeo				
Prata Anã				
FHIA-02				
Calypso				
Maravilha				
Prata Graúda				
Pacovan Ken				
Japira				
Vitória				
Preciosa				
Tropical		X		
Garantida			X	
Princesa		X		
Caprichosa	X			
PA42-44				
FHIA-18				
FHIA-21				
Mysore (controle positivo)			X	
Madu (controle positivo)				X
Perak (controle positivo)	X			
Caipira (controle negativo)				

X = detecção do BSV

Em experimentos realizados por Silveira et al. (2007), o período de expressão dos sintomas variou de 15 a 70 dias após a inoculação e as plantas testes inoculadas com cochonilhas alimentadas nas folhas da 'Mysore' apresentaram sintomas 15 dias após a inoculação. Ainda segundo esses autores, 100% das plantas inoculadas expressaram o sintoma do BSV, quando se utilizou 20 a 30 cochonilhas e três plantas teste para cada acesso.

Em trabalhos realizados em Taiwan por Hwang & Su (1998) quando plantas de cinco a dez centímetros de altura foram inoculadas com BSV, a taxa de infecção chegou a 75%, enquanto o período de incubação médio foi de 22 dias. Quando plantas de 30 cm de altura foram inoculadas com BSV, os valores correspondentes foram 50% infectados, com um período de incubação de 80 dias. Para plantas de 50 cm de altura, apenas 25% foram infectados após um período de incubação de 135 dias.

Todas as plantas teste inoculadas com cochonilhas alimentadas nos acessos utilizados como controle positivo expressaram o sintoma semelhante ao BSV, contudo, as mudas inoculadas com inóculo proveniente do acesso Madu só expressaram sintomas 100 dias após a inoculação (Tabela 12).

O teste biológico evidenciou que a cochonilha permaneceu virulífera até 36 horas após o acesso de aquisição. Uma vez que uma das três plantas de bananeira Caipira que foi inoculada com o BSV após este tempo, expressou sintomas leves de infecção pelo BSV 60 dias após a inoculação.

### **2.3.6. INDEXAÇÃO DE BANANEIRA PARA O BSV POR PCR**

#### **2.3.6.1 EXTRAÇÃO DE DNA**

A análise em gel de eletroforese a 1% mostrou que a extração do DNA das dez amostras foliares de bananeira (uma sadia e nove infectadas pelo BSV) foi realizada com sucesso (Figura 14). Após quantificação, as amostras de DNA foram diluídas para 5 ng/ $\mu$ L e utilizadas para as reações da PCR.

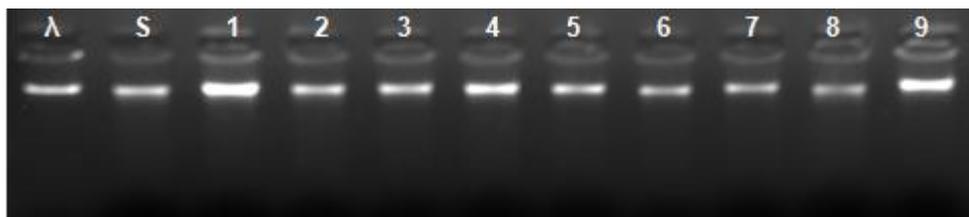


Figura14. Quantificação, em gel de agarose a 1% de DNA de bananeira.  $\lambda$  - Marcador de peso molecular lambda (5  $\mu$ L a 10 ng/ $\mu$ L). S – amostra de banana sadia (10  $\mu$ L + 4  $\mu$ L de corante). 1 a 9 – amostras de banana infectadas com BSV (10  $\mu$ L + 4  $\mu$ L de corante para cada amostra).

### 2.3.6.2 PCR PARA O BSV

Todas as reações foram realizadas com DNA na concentração de 7,5 ng e 0,4  $\mu$ M de *primer*. Com a combinação dos *primers* BADNA1A + MYS3 foi possível amplificar bandas nos tamanhos esperados (600 pb). Todavia, houve amplificação também na amostra supostamente sadia. A reação da PCR resultante dos acessos Who Gru (amostra 4) e Platina (amostra 7) apresentou os melhores resultados para esta combinação de *primer* (Figura 15), quando se utilizou a temperatura de 47 °C para o ciclo curto e 53 °C para o ciclo longo.

Com a combinação BADNA2 + MYS3 (450 pb) para todas as amostras positivas testadas ocorreu amplificação de fragmentos no tamanho esperado (Figura 16), quando a temperatura de anelamento foi de 37 e 55 °C para o ciclo curto e ciclo longo, respectivamente.

Para a combinação BADNA1A + BADNA4 (~400/600 pb) (Figura 17) apenas para algumas amostras obteve-se amplificação de fragmentos nos tamanhos esperados com temperatura de 47 °C no ciclo curto e 56 °C no ciclo longo.

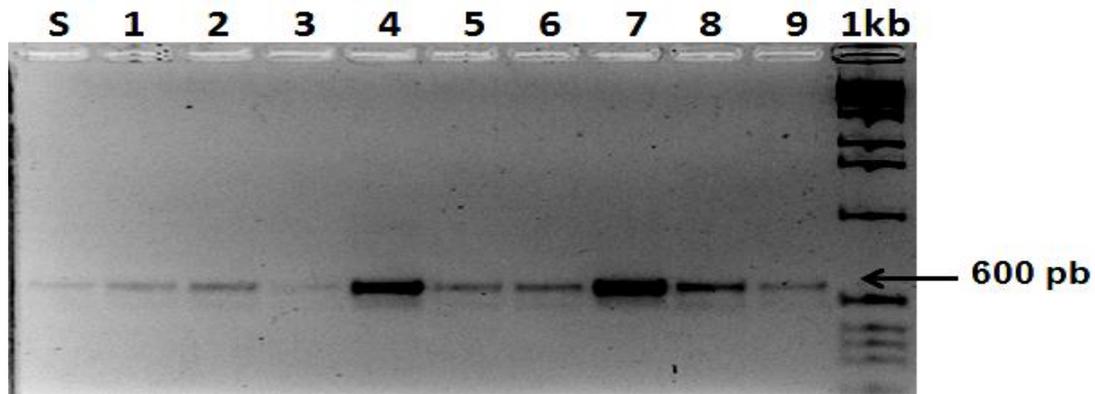


Figura15. Gel de agarose a 1,5% com reação de PCR com a combinação de *primers* BADNA1A + MYS3. S – Amostra de bananeira sadia; 1-9 – Amostras de bananeiras infectadas com BSV. 1Kb - marcador de peso molecular DNA Ladder.

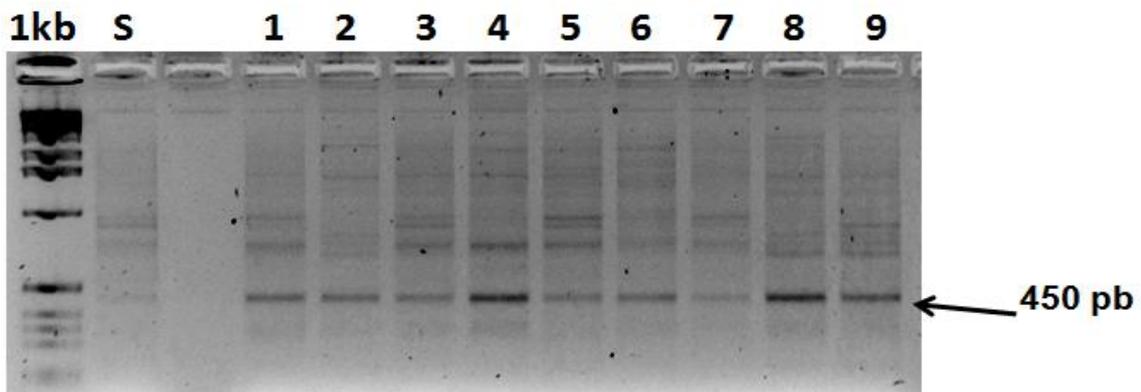


Figura16. Gel de agarose a 1,5% com reação de PCR com a combinação de *primers* BADNA2 + MYS3. S – Amostra de bananeira sadia; 1-9 – Amostras de bananeiras infectadas com BSV. 1Kb - marcador de peso molecular DNA Ladder.

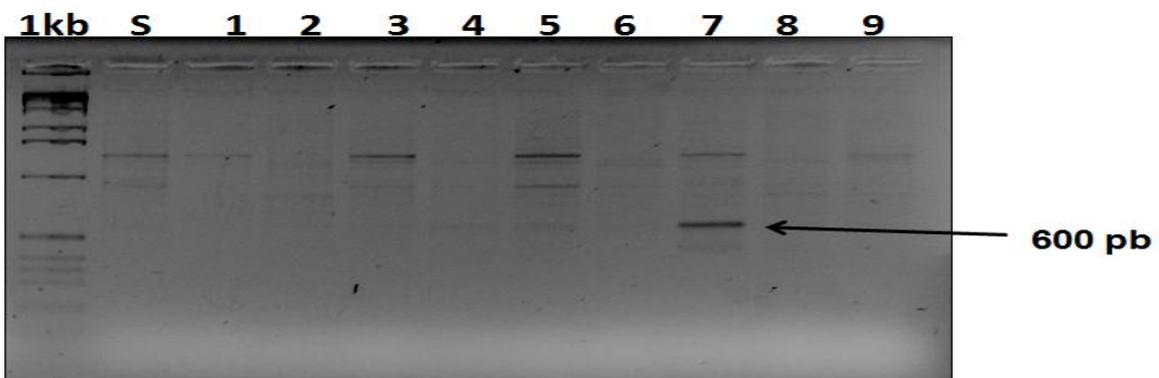


Figura17. Gel de agarose a 1,5% com reação de PCR com a combinação de *primers* BADNA1A + BADNA4. S – Amostra de bananeira sadia; 1-9 – Amostras de bananeiras infectadas com BSV. 1Kb – marcador de peso molecular DNA Ladder.

Figueiredo & Brioso (2007), usando a combinação de *primer* BADNA1A + BADNA4 conseguiram diagnosticar a presença do BSV em amostras de bananeiras provenientes de micropropagação.

As outras combinações de *primers* testadas, BADNA1A + BADNA3, BADNA2 + BADNA4, SCBVVF5 + BADNA3, SCBVVF5 + BADNA4, SCBVVF5 + SCBVVR5 e BADNAT + BADNA3, não amplificaram fragmentos nos tamanhos esperados para as condições em que foram avaliados. A heterogeneidade do BSV pode ter influenciado nos resultados obtidos.

Para Lockhart & Olszewski (1993) os resultados até então obtidos pela PCR para o BSV podem ser otimizados adaptando os métodos de extração de DNA de bananeira, uma vez que os compostos fenólicos e secundários presentes na bananeira podem contaminar o DNA obtido. Além disso, já se sabe que segmentos do genoma do BSV podem estar integrados ao genoma de algumas variedades de bananeira comprometendo a confiabilidade da sua detecção por PCR.

Uma alternativa para aperfeiçoar a extração de DNA em plantas ricas em compostos fenólicos foi proposta por Porebski et al. (1997), envolvendo uma modificação no tampão de extração, aumentando a concentração de sais para a remoção de polissacarídeos e o uso do PVP para remoção dos polifenóis, além de tratamento com RNase e uso de fenol-clorofórmio.

## 2.4 CONCLUSÕES

- As matrizes de bananeira não apresentaram sintomas de infecção pelo CMV e foram ELISA negativas, isto é uma forte evidência de sua sanidade.
- Os sintomas do BSV foram observados nas cultivares Prata Anã, Vitória, Garantida e FHIA-21.
- O teste biológico detectou a presença do BSV nas cultivares Caipira, Tropical, Garantida, Princesa e Caprichosa.
- O uso do protocolo de extração de RNA total, proposto por Wang et al. (2010), possibilitou a extração de RNA total de qualidade de bananeira.
- A análise por PCR, de plantas BSV positivas por indexação biológica, demonstrou que os *primers* relatados por diferentes pesquisadores para a sua detecção, não estão apresentando boa resposta nas condições em que foram avaliados na Embrapa Mandioca e Fruticultura.
- Nas condições em que foram indexadas as matrizes Prata Baby, Grande Naine, Pacovan, Thap Maeo, FHIA 02, Calypso, Maravilha, Prata Graúda, Pacovan Ken, Japira, Preciosa, Caprichosa, PA 42-44 e FHIA 18 foram consideradas livres do CMV e BSV.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste trabalho, o matrizeiro de bananeira com 21 diferentes cultivares foi indexado para o CMV por ELISA direto e para o BSV por teste biológico. As dificuldades encontradas e o tempo gasto para ajustar a metodologia de extração de RNA total de bananeira de qualidade, aliado ao tempo disponível para a apresentação destes resultados não permitiram que todo o material avaliado fosse indexado para o CMV por RT-PCR. A não identificação de uma planta de bananeira infectada com o CMV dificultou a continuação dos ajustes no ELISA e RT-PCR.

A detecção do BSV por indexação biológica é uma excelente alternativa, uma vez que não é um método muito específico e permite a detecção de diferentes isolados. A variabilidade genética do BSV associado a possibilidade da existência de suas sequências integradas no genoma de bananeira, tem dificultado o seu diagnóstico utilizando a PCR.

A purificação e o sequenciamento das estirpes de CMV e BSV presentes no BAG de banana, em trabalhos futuros, permitirão o conhecimento da sua variabilidade genética. Os experimentos com avaliação e ajustes de métodos de indexação para CMV e BSV em bananeira precisam ser continuados para definir questões levantadas neste trabalho.

## REFERÊNCIAS

- AHLAWAT, Y.S.; PANT, R.P.; LOCKHART, B.E.L.; SRIVASTAVA, M.; CHAKRABORTY, N.K.; VARMA, A. 1996 - Association of badnavirus with citrus mosaic disease in India. **Plant Disease** 80: 590-592.
- ALVES, E.J. 1999. **A cultura da bananeira**: aspectos técnicos, socioeconômicos e agroindustriais. Brasília: Ministério da Agricultura e do Abastecimento / Embrapa / Centro Nacional de Pesquisa de Mandioca e Fruticultura EMBRAPA/CNPMPF, 2ª edição revisada, p. 585.
- ATKINSON, H.; DALE, J.; HARDING, R., KIGGUNDU, A.; KUNERT, K.; MUCHWEZI, J.M.; SAGI, L.; VILJOEN, A. 2003. Genetic transformation strategies to address the major constraints to banana and plantain production in Africa. **INIBAP**: Montpellier (FRA), 130p.
- ARIAS, G.G.; FONT, C.; MIRANDA, E. 2002. *Planococcus minor* (markell), vector del virus estriado del plátano (BSV). **Fitosanidad**, vol. 6, no. 2.
- BALACHOWSKY, A.M. 1935. **Les cochenilles paleartiques de la Tribu Diaspini**. Paris: Institute Pasteur. 450p.
- BELALCAZAR CARVAJAL, S. L. 1991. **El cultivo del plátano en el tropico**. Montepillier: INIBAP/ICA. 376p. (Manual de Asistencia técnica, 50)
- BEN-DOV, Y. 1994. **A systematic catalogue of the mealybugs of the world (Insecta: Homoptera: Coccoidea: Pseudococcidae and Putoidae) with data on geographical distribution, host plants, biology and economic importance**. Andover: Intercept. 686 p.
- BOAS, C.V.; TENENTE, R.C.V.; GONZAGA, V.; NETO, S.P. da S.; ROCHA, H.S. 2002. Reação de clones de bananeira (*Musa* spp.) ao nematóide *Meloidogyne incognita* (Kfoid & White, 1919) Chitwood, 1949, raça 2. **Revista brasileira de fruticultura**, Jaboticabal - SP, v. 24, n. 3, p. 690-693.
- BOARI, A. de J. 1998. Caracterização biológica e molecular de isolados de Virus do mosaico do pepino (CMV) e RNAs Satélites associados. **Tese de doutorado em Fitopatologia**. Escola de Agronomia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. 82 f.
- BORGES, A.L.; OLIVEIRA, A.M.G.; RITZINGER, C.H.S.P.; ALMEIDA, C.O. de; COELHO, E.F.; SANTOS-SEREJO, J.A. dos; SOUZA, L. da S.; LIMA, M.B.; FANCELLI, M.; FOLEGATTI, M.I. da S.; FILHO, P.E.M.; SILVA, S. de; MEDINA, V.M.; CORDEIRO, Z.J.M. 2006. **A cultura da banana**. Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical. 3ª ed. rev. e amp. – Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, (Coleção Plantar, 56).
- BOUHIDA, M. & LOCKHART, B.E. 1990. Increase in importance of cucumber mosaic virus infection in greenhouse-grown in Morocco. *Phytopathology*. In:

SILVA NETO, S.P. da, SILVA, M.S. 2009. Cultura de tecidos no controle de viroses da bananeira no Brasil. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados. 29p.

BRAITHWAITE, K.S.; EGESKOV, N.M.; SMITH, G.R. 1995. Detection of sugarcane bacilliform virus using the polymerase chain reaction. **Plant Disease** 79: 792-796.

BRIGNETI, G.O.; VOINNET, W-X. L.I.; DING, L.-H.; JI, S.-W; BAULCOMBE, D. C. 1998. In: ROOSSINCK, M.J. Evolutionary History of *Cucumber Mosaic Virus* Deduced by Phylogenetic Analyses. *Journal of virology*, Apr. 2002, p. 3382–3387.

BRIOSO, P.S.T. Importance and current status of *Badnavirus* genus. **Virus Reviews & Research**, v.9, n. 1, p.49-50, 2004., São Paulo.

BRIOSO, P.S.T.; CORDEIRO, Z.J.M.; REZENDE, J.A.M.; KITAJIMA, E.W.; PIMENTEL, J.P.; FIGUEIREDO, A.R. 2000. Infecção mista em bananeiras pelo vírus do mosaico do pepino (Cucumber mosaic virus-CMV) e da risca da bananeira (Banana streak virus-BSV) no Brasil. **Summa Phytopathologica**, v.26, n.2, p.255-257.

CASTRO, P.R.C.; KLUGE, R.A.; SESTARI, I. 2008. **Manual de Fisiologia Vegetal: fisiologia dos cultivos** – Piracicaba: Editora Agronômica Ceres, 864p.

CHEN, Y.; CHEN, J.; ZHANG, H.; TANG, X.; DU, Z. (2007) Molecular evidence and sequence analysis of a natural reassortment between Cucumber mosaic virus subgroup IA and II strains. **Virus Genes** 35:405–413.

COLARICCIO, A. 2009. Principais medidas de convivência com viroses na cultura da bananeira – *Musa* spp. **Instituto Biológico**. São Paulo.

COLARICCIO, A.; CHAVES, A.L.R.; EIRAS, M.; PALAZZO, S.R.L.; MOREIRA, S. M.; MATTOS, M.A.N. 2006. Detecção do *Banana streak virus* (BSV) em mudas de meristemas de banana importadas. **Summa Phytopathologica**, v.32, suplem., p.S96 S97.

COLARICCIO, A.; EIRAS, M., VICENTE, M.; CHAGAS, C.M.; HARAKAVA, R. 1996. Caracterização parcial de um isolado do vírus do mosaico do pepino de *Musa* sp. “nanição”. **Fitopatologia Brasileira** 21:268-274.

COSTA, C.L. 2002. Inter-relações dos insetos vetores com vírus de plantas frutíferas cultivadas no Brasil. In Zambolim, L. (Ed.) Manejo Integrado – Fruteiras Tropicais. Doenças e Pragas. Viçosa, UFV. p.105-153.

CORDEIRO, Z.J.M. & MOREIRA, R. S. 2006. A bananicultura brasileira: um negócio sustentável. IN: Reunião Internacional Acorbat, 17, Joinvile. **Anais...** Joinvile. ACORBAT/ACAFRUTA, v. 1, p. 36-47.

CORDEIRO, Z.J.M.; MATOS, A.P.; KIMATI, H. 2005. Doenças da bananeira. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M. BERGAMIN FILHO, A.;

CAMARGO, L.E.A.; (Ed.). **Manual de fitopatologia**. São Paulo: Agronômica Ceres, v. 2, p. 99-117.

CORDEIRO, Z. J. M. 2000. **Banana Produção: aspectos técnicos**. Brasília: Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia. 143p; (Frutas do Brasil; 1).

CORDEIRO, Z.J.M., MATOS, A. P. 2003. Doenças da Bananeira. In FREIRE, F.C.O., CARDOSO, J.E., VIANA, F.M.P (eds.) **Doenças de Fruteiras Tropicais de Interesse Agroindustrial**. Embrapa Informações Tecnológica, Brasília, DF, 687p.

CORDEIRO, Z. J. M.; MATOS, A. P.; MEISSNER FILHO, P. E. 2004. Doenças e Métodos de Controle. In: **Cultivo da bananeira**. (Eds.: Borges, A. L. & Silva Souza, L.). Embrapa Mandioca e Fruticultura, 279p.

CORDEIRO, Z. J. M.; BORGES, A. L.; FANCELLI, M. et al. 2003. **Cultivo da banana para o estado do Amazonas**. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura.

CORREA, L. R. B. 2006. Efeitos de diferentes temperaturas e substratos alimentares sobre o desenvolvimento da cochonilha-branca *Planococcus citri* (Risso, 1813) (Hemiptera: Pseudococcidae). 33f. **Monografia** (Bacharelado) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

CÔTE, F.X.; GALZI, S.; FOLLIOT, M.; LAMAGNÈRE, Y.; TEYCHENEY, P.; ISKRA-CARUANA, M. L. 2010. Micropropagation by tissue culture triggers differential expression of infectious endogenous *Banana streak virus* sequences (eBSV) present in the B genome of natural and synthetic interspecific banana plantains. **Molecular Plant Pathology**, v.11, p.137-144.

DAHAL, G.; GAUHL, F.; PASBERG-GAUHL, C.; HUGHES, J.D'a. THOTTAPPILLY, G. & LOCKHART B.E.L. 1999. Evaluation of micropropagated plantain and banana (*Musa spp.*) for *Banana streak badnavirus* incidence under field and greenhouse conditions in Nigeria. **Annals of Applied Biology**. 134:181–91

DALLOT, S.; ACUÑA, P.; RIVERA, C.; RAMIREZ, P.; CÔTE, F.; LOCKHART, B.E.L.; CARUANA, M.L. 2001. Evidence that the proliferation stage of micropropagation procedure is determinant in the expression of *Banana streak virus* integrated in the genome of FHIA 21 hybrid (*Musa AAAB*). **Archives of Virology**, v.146, n. 11, p.2179-2190.

DANTAS, J.L.L.; SOARES FILHO, W. dos S. 2000. Classificação botânica, origem e evolução. In: CORDEIRO, Z.J.M. (Org.). **Banana. Produção: aspectos técnicos**. Brasília, DF: **Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia**, p. 12-16.

DANTAS, A.C.V.L.; DANTAS, J.L.L.; ALVES, E.J. 1999. A cultura da banana: aspectos técnicos, socioeconômicos e agroindustriais. Brasília: **EMBRAPA-**

**SPI/Cruz das Almas**, 2<sup>o</sup> edição, ver. - 585p.

DHEEPA, R. & PARANJOTHI, S. 2010. Transmission of Cucumber Mosaic Virus (CMV) infecting banana by aphid and mechanical methods. **Emir. J. Food Agric.** 2010. 22 (2): 117-129.

DIEKMANN, M. & PUTTER, C. A. J. 1996. FAO/IPGRI Technical guidelines for the safe movement of germplasm. In: PIETERSEN, G. & THOMAS, J.E. Overview of Musa virus diseases. Plant virology in sub-Saharan Africa.

DING, S-W.B.J.; ANDERSON, H.; HAASE, R.; SYMONS, R.H. 1994. In: ROOSSINCK, M. J. 2002. Evolutionary History of *Cucumber Mosaic Virus* Deduced by Phylogenetic Analyses. **JOURNAL OF VIROLOGY**, p. 3382–3387.

DONATO S.L.R.; OLIVEIRA E SILVA, S.; LUCCA FILHO, O.A.; LIMA, M.B.; DOMINGUES, H.; ALVES, J.S. 2006. Comportamento de variedades e híbridos de bananeira (*Musa* spp.), em dois ciclos de produção no sudoeste da Bahia. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal - SP, v. 28, n. 1, p. 139-144, Abril

DONATO, S.L.R. de O.; PASSOS, A.R.; LIMA NETO, F.P.; LIMA, M.B. de . 2008. Avaliação de variedades e híbridos de bananeira sob irrigação. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 25, n 2, p. 348-35

DOYLE, J.J. & DOYLE, J.L. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochem. Bull.**, 19: 11-15.

EDWARDS, M.C. & GONSALVES, D. 1983. Grouping of 7 biologically defined isolates of cucumber mosaic virus by peptide-mapping. In: CHOU, C-N; CHEN, C-E; WU, M-L; SU, H-J e YEH, H-H. Biological and Molecular Characterization of Taiwanese Isolates of Cucumber mosaic virus Associated with Banana Mosaic Disease. **J. Phytopathology** 157, 85–93 (2009).

EDWARDSON, J.R. & CHRISTIE, R.G. 1991. In: ROOSSINCK, M.J. Evolutionary History of *Cucumber Mosaic Virus* Deduced by Phylogenetic Analyses. **Journal of virology**, Apr. 2002, p. 3382–3387.

EIRAS, M.; COLARICCIO, A.; CHAVES, A. L. R. 2001. Isolado do vírus do mosaico do pepino obtido de bananeira no Estado de São Paulo pertence ao subgrupo Ia. **Fitopatologia Brasileira**, 26:53-59.

ESCRUI, F.; PERRY, K.L.; GARCIA, A.F. (2000) Transmissibility of Cucumber mosaic virus by *Aphis gossypii* correlates with viral accumulation and is affected by the presence of its satellite RNA. **Phytopathology** 90:1068–1072.

FANG, G.; HAMMAR, S.; REBECCA, R. 1992. A quick and inexpensive method for removing polysaccharides from plant genomic DNA. **Biotechniques** 13: 52–56.

**FAO.** Food and Agriculture Organization of United Nations. Disponível em: <http://faostat.fao.org/>. Acesso em: 01 de maio de 2011.

FAUQUET, C.; MAYO, M.; MANILOFF, J.; DESSELBERGER, U.; BALL L (eds). 2005. Virus Taxonomy, VIIIth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. In: CHOU, C-N; CHEN, C-E; WU, M-L; SU, H-J e YEH, H-H. Biological and Molecular Characterization of Taiwanese Isolates of Cucumber mosaic virus Associated with Banana Mosaic Disease. *J. Phytopathology* 157, 85–93 (2009)

FIGUEIREDO, D.V.; BRIOSO, P.S.T.; MARINHO, V.L.A. 2007. Detecção do *Banana streak virus* (BSV) em bananeiras micropropagadas. **Summa phytopathologica**, v. 33, n.3, p. 229-232.

FIGUEIREDO, D.V.; MEISSNER FILHO, P.E.; SILVA NETO S.P.; BRIOSO, P.S.T. 2006. Detection and analysis of *Banana streak virus* (BSV) sequences variability of banana from Brazil. **Summa Phytopathologica**, v.32, n. 2, p. 118-123.

FIGUEIREDO, D.V.; BRIOSO, P.S.T., MARINHO, V.L.A. 2003. Detecção do *Banana streak virus* (BSV) em bananeiras micropropagadas provenientes de Israel. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 28 (suplemento), p. 371, Nov./dez.

FIORAVANÇO, J.C. 2003. Mercado mundial de banana: produção, comércio e participação brasileira. **INFORMAÇÕES ECONÔMICAS**, São Paulo, v.33 n.10.

FRANCELLI, M. 2003. **Cultivo de banana para o Estado do Amazonas**. Embrapa Mandioca e Fruticultura. Versão eletrônica: Janeiro.

FURUYA, N.; SOMOWIYARJO, S.; NATSUAKI, K. 2004. Virus detection from Local Banana Cultivars and the First Molecular Characterization of Banana bunchy top virus in Indonésia. **Journal Agriculture Science** 49 (3), 75-81.

GAFNY, R.; WEXLER, A.; MAWASSI, M.; ISRAELI, Y.; BARJOSEPH, M. 1996. Natural infection of banana by a satellite-containing strain of cucumber mosaic virus: Nucleotide sequence of the coat protein gene and the satellite RNA. **Phytoparasitica** 24:49–56.

GALLITELLI, D. 2000. The ecology of Cucumber mosaic virus and sustainable agriculture. **Virus Research** 71: 9–21

GAMBLEY, C.F. & THOMAS, J.E. 2001. Molecular characterization of banana mild mosaic virus: a new filamentous virus in *Musa* spp. In: PIETERSEN, G. & THOMAS, J.E. Overview of *Musa* virus diseases. *Plant virology in sub-Saharan Africa*.

GAYRAL, P. & ISKRA-CARUANA, M. 2009. Phylogeny of *Banana streak virus* reveals recent and repetitive endogenization in the genome of its host (*Musa* sp.). **Journal of Molecular Evolution**, v.69, n. 1, p. 65-80.

GANGA, R.M.D. 2002. Resultados parciais sobre o comportamento de seis cultivares de banana (*Musa* spp) em Jaboticabal. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 17, 2002, Belém. **Anais...** Belém Embrapa/DDT. CD- ROM.

GASPAROTTO, L.; COELHO, A.F.S.; PEREIRA, M.C.N.; CORDEIRO, Z.J.M.; OLIVEIRA E SILVA, S. 1999. Thap Maeo e Caipira: cultivares de bananeira resistentes à Sigatoka negra, para o estado do Amazonas. Embrapa Amazonia Ocidental. **Comunicado Técnico**, 2. Disponível em: <http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/handle/doc/668482>

GEERING, A.D.W. 2009. Viral Pathogens of Banana: Outstanding Questions and Options for Control. **Acta Hort.** 828, ISHS.

GRAVENA, S. 2003. Manejo ecológico da cochonilha-branca dos citros, com ênfase no controle biológico pela joaninha *Cryptolaemos montrouzieri*. **Laranja**, Cordeirópolis v.24, n.1, p.71-82.

HABILI, N. & FRANCKI, R. I. 1974. Comparative studies on tomato aspermy and cucumber mosaic viruses. In: CHOU,C-N; CHEN, C-E; WU, M-L; SU, H-J e YEH, H-H. 2009. Biological and Molecular Characterization of Taiwanese Isolates of Cucumber mosaic virus Associated with Banana Mosaic Disease. *J. Phytopathology* 157, 85–93.

HADIDI, A, MONTASSER, M. S. & LEVY, L.1993. Detection of potato leafroll and strawberry mild yellow-edge luteoviruses by reverse transcription-polymerase chain reaction amplification. **Plant Disease**, v.75, p.595-601.

HANADA K, TOCHIHARA H. 1980. Genetic analysis of cucumber mosaic, peanut stunt and chrysanthemum mild mottle viruses. In: CHOU,C-N; CHEN, C-E; WU, M-L; SU, H-J e YEH, H-H. 2009. Biological and Molecular Characterization of Taiwanese Isolates of Cucumber mosaic virus Associated with Banana Mosaic Disease. *J. Phytopathology* 157, 85–93.

HARPER, G.; HULL, R. 1998. Cloning and sequence analysis of *Banana streak virus* DNA. In: LOMBARDI, R. 2010. Clonagem e purificação da proteína capsidial do *Banana streak virus* e produção de antissoro policlonal a partir de preparações purificadas do vírus. Dissertação (Mestrado) Instituto Biológico (São Paulo). Programa de Pós-Graduação, São Paulo.

HARPER, G.; HART, D.; MOULT, S.; HULL, R. 2002. Detection of *Banana streak virus* in field samples of bananas from Uganda. **Annals of Applied Biology**, London, v. 141, nº 3, p.247-257.

[http://www.acervodigital.ufrj.br/insetos/insetos\\_do\\_brasil/](http://www.acervodigital.ufrj.br/insetos/insetos_do_brasil/). Acesso em: 06 abr. 2011.

<http://minhasfrutas.blogspot.com/200>. Frutas do Brasil: fruticultura e café. Acesso em: 06 abr. 2011.

<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/>. Sistema de Produção de banana para o Estado do Pará. Acesso em: 06 abr. 2011.

HU, J.S.; LI, H.P.; BARRY, K.; WANG, M.; JORDAN, R. 1995. Comparison of dot blot, ELISA and RT-PCR assays for detection of two cucumber mosaic virus isolates infecting banana in Hawaii. **Plant Disease** 79:902-906.

HULL, R.; GEERING, A.; HARPER, G.; LOCKHART, B.E.; SCHOELZ, J.E. 2005. Family *Caulimoviridae*. IN: LOMBARDI, R. 2010. Clonagem e purificação da proteína capsidial do *Banana streak virus* e produção de antissoro policlonal a partir de preparações purificadas do vírus. Dissertação (Mestrado) Instituto Biológico (São Paulo). Programa de Pós-Graduação, São Paulo.

HWANG, S-C. & SU, H-J. 1998. Production of Virus-Free Banana Plantlets in Taiwan. **Food & Fertilizer Technology Center**.

**IBGE**. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Disponível em: <http://www.sidra.ibge.gov.br/>. Acesso em 22 de julho de 2011.

**ICTVdB** – International Committee on Taxonomy of viruses -The Universal Virus Database, version 4. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/ICTVdB/>. Acesso em 23/04/2011.

JAMES, A.P.; GEIJSKES, R.J.; DALE, J.L.; HARDING, R.M. 2011. Development of a novel rolling-circle amplification technique to detect *Banana streak virus* that also discriminates between integrated and episomal virus sequences. **Plant Disease**. 95:57-62.

JAUFERALY-FAKIM, Y.; KHORUGDHARY, A.; HARPER, G. 2006. Genetic variants of *Banana streak virus* in Mauritius. **Virus Research**, v.115, p.91-98.

JONES, D., ISKRA, M. L. 1993. Risk involved in the transfer of banana and plantain germplasm. **INIBAP**. Annual Report, Montpellier, França, p. 39-47.

JONES, D.R. & B.E.L. LOCKHART. 1993. Banana streak disease. *Musa* disease fact sheet no.1. **INIBAP**, Montpellier, France.1p.

JUNGHANS, T.G. & SILVA SOUZA, A. (Eds). 2009. **Aspectos Práticos da Micropropagação de Plantas**. Embrapa Mandioca e Fruticultura: Cruz das Almas-BA. 385 p.

KAPER, J.M. & TOUSIGNANT, M.E. 1977. Cucumber mosaic virus-associated RNA 5. I. Role of host plant and helper strain in determining amount of associated RNA 5 with virions. In: CHOU, C-N; CHEN, C-E; WU, M-L; SU, H-J e YEH, H-H. Biological and Molecular Characterization of Taiwanese Isolates of Cucumber mosaic virus Associated with Banana Mosaic Disease. *J. Phytopathology* 157, 85–93 (2009).

KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E. A.2005. **Manual de Fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. vol. 2, 4 ed. Editora Agronômica Ceres, São Paulo. 663 p.

LASSOUDIÈRE, A. La mosaïque dite “a tirets” du bananier ‘Poyo’ en Côte d’Ivoire. **Fruits**, v.29, p.349-357, 1974.

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

LIMA, M.B.; SILVA, S. de O.; FERREIRA, C.F. 2003. **Banana: O produtor pergunta, a Embrapa responde**. Brasília, DF: Embrapa Mandioca e Fruticultura. 182p.

LIMA & GONÇALVES, 1988. IN:PAZ LIMA, M.L. Estudos em doenças de plantas. Disponível em:<http://www.fitopatologia1.blogspot.com>., acessado em 01 de abril de 2011.

LIMA, M.B.; OLIVEIRA E SILVA, S.; JESUS, O.N. de; OLIVEIRA, W.S.J. de; GARRIDO, M.S.; AZEVEDO, R.L. 2005. Avaliação de cultivares e híbridos de bananeira no recôncavo baiano. **Ciênc. agrotec.**, Lavras, v. 29, n. 3, p. 515-520, maio/jun.

LIN, H-X.; RUBIO, L.; SMYTHE, A-B.; FALK, B-W. 2004. Molecular population genetics of Cucumber mosaic virus in California: evidence for founder effects and reassortment. **Journal of Virology** 78:6666–6675.

LOCKHART, B.E.L.; JONES, D.R. 2000. Banana mosaic. In: SILVA NETO, S. P. da, SILVA, M. S. 2009. Cultura de tecidos no controle de viroses da bananeira no Brasil. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados. 29p.

LOCKHART, B.E.L. & D.R. JONES. 2000. Banana streak. Pages 263–274 In: G. PIETERSEN and J.E. THOMAS. Overview of Musa virus diseases. Plant virology in sub-Saharan Africa.

LOCKHART, B.E.L. 1995. Development of detection methods for banana streak virus (BSV). **INIBAP Annual Report** 1994. Page 20. International Network for the Improvement of Banana and Plantain, Montpellier, France.

LOCKHART, B.E.L. and N.E. OLSZEWSKI. 1993. Serological and genomic heterogeneity of banana streak *Badnavirus*: implications for virus detection in *Musa* germplasm. Pages 105–113. IN: G. PIETERSEN and J.E. THOMAS. **Overview of Musa virus diseases**. Plant virology in sub-Saharan Africa.

LOCKHART, B.E.L. 1986. Purification and serology of a bacilliform virus associated with banana streak disease. **Phytopathology** 76: 995–999.

LOCKHART, B.E.L. & OLSZEWSKI, N.E. Serological and genomic heterogeneity of *Banana streak badnavirus*: implications for virus detection in *Musa* germplasm. In: International Symposium on Genetic Improvement of Bananas for Resistance to Diseases and Pests, 1993, Montpellier. **Proceedings**. Montpellier: Dirad-Flhor & Inibap, 1993. p.105-113.

LOMBARDI, R. 2010. Clonagem e purificação da proteína capsidial do *banana Streak virus* e produção de antissoro policlonal a partir de Preparações purificadas do vírus. **Dissertação** (Mestrado em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio) – Instituto Biológico. São Paulo.

LLORENS, J.M. 1990. **Homoptera I – Cochinillas de los cítricos y su control biológico**. Valencia: PISA Ediciones 260p.

LOT, H. & KAPER, J.M. 1976. Physical and chemical differentiation of three strains of Cucumber mosaic virus and peanut stunt virus. In: CHOU, C-N; CHEN, C-E; WU, M-L; SU, H-J e YEH, H-H. Biological and Molecular Characterization of Taiwanese Isolates of Cucumber mosaic virus Associated with Banana Mosaic Disease. *J. Phytopathology* 157, 85–93 (2009).

MACIEL-ZAMBOLIM, M. et al., 1994. IN:PAZ LIMA, M.L. Estudos em doenças de plantas. Disponível em:<http://www.fitopatologia1.blogspot.com>., acessado em 01 de abril de 2011.

MANICA, I.1998. **Bananas: do plantio ao amadurecimento**- Porto Alegre: Cinco Continentes, 99p.

MARINHO, V.L.A. & BATISTA, M.F. 2005. Interceptação, pelo Serviço de Quarentena, de vírus em Mudas Meristemáticas de Bananeiras Importadas. **Fitopatologia brasileira**, v. 30, nº .5, p. 552, set./out.

MARINHO, V.I.A., ANJOS, V.S., BATISTA, M.F. 2007. Vírus detectados em germoplasma vegetal introduzido no Brasil pelo laboratório de quarentena (2004-2007) **Comunicado Técnico** 172- ISSN 9192-0099. Brasília, DF.

MATTHIESEN, M.L. & BOTEON, M. **ANÁLISE DOS PRINCIPAIS PÓLOS PRODUTORES DE BANANA NO BRASIL**. Disponível em: <http://www.cepea.esalq.usp.br/pdf/banana.pdf>. Acesso em 23-02-11

MEDEIROS, 1963 IN:PAZ LIMA, M.L. **Estudos em doenças de plantas**. Disponível em:<http://www.fitopatologia1.blogspot.com>., acessado em 01 de abril de 2011.

MEISSNER FILHO, P.E. 2010. **Indexação de plantas para viroses**. Disponível em: <http://www.agrosoft.org.br/agropag/216397.htm>

MEISSNER FILHO, P.E. 2009. **Indexação de plantas para viroses**. In: JUNGHANS, T.G. & SILVA SOUZA, A. (Eds). 2009. Aspectos Práticos da Micropropagação de Plantas. Embrapa Mandioca e Fruticultura: Cruz das Almas-BA. 385 p.

MEISSNER FILHO, P.E. & BRIOSO P.S.T. 2000. **Frutas do Brasil**. Banana fitossanidade. Doenças causadas por vírus. Brasília. Embrapa. p.78-81.

MORANDI FILHO, W.J. Cochonilhas-farinhentas associadas à videira na Serra Gaúcha, bioecologia e controle de *Planococcus citri* (Risso, 1813) (Hemiptera: Pseudococcidae). **Tese** (Doutorado em Entomologia). Pelotas, 2008.

MOREIRA, R.S. 1987. **Banana: teoria e prática de cultivo**. Fundação Cargill. Campinas, 335p.

MOURY, B. 2004. **Molecular Biology and Evolution** vol. 21 no. 8 \_ Society for Molecular Biology and Evolution. Disponível em: <http://mbe.oxfordjournals.org>. Acesso em: 01/07/2011.

NIBLETT, C.L.; PAPPU, S.S.; BIRD, J.; LASTRA, R. Infectious Chlorosis, mosaic and heart rot. 1994. In: SILVEIRA, D. G. Indexação de bananeiras para viroses e efeitos do BSV no desenvolvimento de plântulas micropropagadas. 2001. 76 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias). Escola de Agronomia, Universidade Federal da Bahia, Cruz das Almas.

NDOWORA, T.; DAHAL, G.; LA FLEUR, D.; HARPER, G.; HULL, R.; OLSZEWSKI, N.E.; LOCKHART, B.E.L. 1999. Evidence that badnavirus infection in *Musa* can originate from integrated pararetroviral sequences. **Virology**, v.255, p.214-220.

NÓBREGA, J.P.R. 2006. Produção de mudas de bananeira (*Musa* sp. AAB) em função da poda e doses de nitrogênio e boro. **Dissertação** (Mestrado em Agronomia)- Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal da Paraíba, Areia – PB, 97 fls.

OLIVEIRA e SILVA, S.; AMORIM, E.P.; SANTOS-SEREJO, J.A. 2008. Estratégias para o melhoramento genético da bananeira. **XII Simpósio de Atualização em Genética e Melhoramento de Plantas**.

OWEN, J. & PALUKAITIS, P. 1988. Characterization of cucumber mosaic virus: 1. Molecular heterogeneity mapping of RNA-3 in 8 CMV strains. **Virology** 166(2):495-502.

PALUKAITIS, P.; ROOSSINCK, M.J.; DIETZGEN, R.G.; FRANCKI, R.I.B. 1992. Cucumber mosaic virus. **Advances in Virus Research**, v.41, p.281-348.

PEDEN, K.W. & SYMONS, R.H. 1973. Cucumber mosaic virus contains a functionally divided genome. **Virology** 53: 487–492

PEREIRA, L.V.; CORDEIRO, Z.J.M.; FIGUEIRA, A.R.; HINZ, R.M.; MATOS, A.P. 1999. Doenças da bananeira. **Informe Agropecuário**, v. 20, n. 196, p. 37-47.

PLOETZ, R.C.; ZENTMYER, G.A.; NISHIJIMA, W.T.; ROHRBACH, K.G.; OHR, H.D. 1994. **Compendium of tropical fruit diseases**. Saint Paul. APS Press.

PIETERSEN, G.; THOMAS, J.E. 2001. **Overview of virus Musa disease**. Plant virology in sub-Saharan Africa.

POREBSKI, S.; BAILEY, L-G.; BERNARD, R. 1997. Modification of a CTAB DNA extraction protocol for plants containing high polysaccharide and polyphenol components. **Plant Mol Bio Report**. 15(1):8-15.

RAMIREZ, P.; RIVERA, C.1994. **Enfermidades virales in banana y plátano**. In: Reunión De La Asociacion Para La Cooperacion En Investigacion De Banano En Caribe y En America Tropical, 10, 1991.Tabasco. Memorias... San José: CORBANA. p. 223-230.

RIBEIRO et al., 1975. In: PAZ LIMA, M.L. **Estudos em doenças de plantas**. Disponível em:<http://www.fitopatologia1.blogspot.com>., acessado em 01 de abril de 2011.

RIPA, R.; RODRIGUEZ, F. 1999. **Plagas de cítricos, sus enemigos naturales y manejo**. Santiago: Instituto de Investigaciones Agropecuarias. 151p. (INIA Libros, 3).

ROOSSINCK, M.J. 2002. Evolutionary History of *Cucumber Mosaic Virus* Deduced by Phylogenetic Analyses. **Journal of virology**, April, p. 3382–3387. Vol. 76, nº. 7.

ROOSSINCK, M.J. 2001. *Cucumber mosaic virus*, a model for RNA virus evolution. **Molecular Plant Pathology**. v.2, p 59-63.

ROOSSINCK, M.J.; ZHANG, L.; HELLWALD, K.H. 1999. Rearrangements in the 5' nontranslated region and phylogenetic analyses of cucumber mosaic virus RNA 3 indicate radial evolution of three subgroups. **Journal of Virology** 73:6752–6758.

SANTOS, A.F.J. 2010. Análise da expressão gênica em bananeira cultivada com Silício e inoculada com *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense*. **Dissertação de mestrado em Microbiologia Agrícola**, UFRB, Cruz das Almas, BA

SEBRAE, Banana: **Estudos de Mercado SEBRAE/ESPM** 2008. Relatório Completo

SHARMAN, M.; THOMAS, J.E.; DIETZGEN R.G. 2000. Development of a multiplex immunocapture PCR with colourimetric detection for viruses of banana. **Journal of Virological Methods**, London, v. 89, n. 1, p. 75-88.

SHEPHERD, 1990. In: Classificação Botânica, Origem e Evolução. DANTAS, J.L.L. e SOARES FILHO, W.S. Frutas do Brasil. Disponível em [http://www.ceinfo.cnpat.embrapa.br/arquivos/artigo\\_2317.pdf](http://www.ceinfo.cnpat.embrapa.br/arquivos/artigo_2317.pdf). Acesso em: 22/04/11.

SIMMONDS, N.W. **Los plátanos**. Barcelona: Editorial Blume. 1973. 539p.

SILVA, A.G.A.; GONÇALVES, C.R.; GALVÃO, D.M.; GONÇALVES, A.J.L.; GOMES, J.; SILVA, M. do N.; SIMONI, L. de. 1968. **Quarto catálogo dos**

**insetos que vivem nas plantas do Brasil:** seus parasitas e predadores. Rio de Janeiro: Ministério da Agricultura, 622p.

SILVA, E.A. da; BOLIANI, A.C.; CORRÊA, L. de S. 2006. Avaliação de cultivares de bananeira (*Musa* sp) na região de Selvíria-MS, **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal - SP, v. 28, n. 1, p. 101-103.

SILVA, S.O.; PEREIRA, L.V.; RODRIGUES, M.G.V. 2008. Variedades. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 29, n 245.p. 78-83, jul/ago.

SILVA NETO, S.P. da & SILVA, M.S. 2009. **Cultura de tecidos no controle de viroses da bananeira no Brasil**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados. 29p.

SILVEIRA, D.G.; MEISSNER FILHO, P.E; SOARES, T.M.; SANCHES, N.F.; FIGUEIREDO, D.V.; BRIOSO, P.S.T. 2008. Indexação biológica de genótipos de bananeira para o Banana streak vírus. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 34, nº 2, p. 172-174.

SILVEIRA, D.G.; SOARES, T.M.; MEISSNER FILHO, P.E.; LIMA NETO, F.P.; CALDAS, R.C. 2007. Efeitos do Banana streak vírus no desenvolvimento de cultivares de bananeira. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 33, nº 2, p. 190-191.

SILVEIRA, D.G.; SOUZA, A. da S.; MEISSNER FILHO, P.E.; SOARES, T.M.; CALDAS, R.C.; LEÃO, K.R.B. 2006. Efeito do vírus das estrias da bananeira na micropropagação e no crescimento das plantas da Cultivar caipira durante a aclimatização. **Plant Cell Culture & Micropropagation**, Lavras, v. 2, n. 2, p. 74-79, 2006

SILVEIRA, D.G.; MEISSNER FILHO, P.E.; SOARES, T.M. 2004. Indexação de germoplasma de bananeira para o vírus do mosaico do pepino. **Magistra**, Cruz das Almas-BA, v. 16, n. 1, p. 42-46, jan./jun.

SILVEIRA, D.G. 2001. Indexação de bananeiras para viroses e efeitos do BSV no desenvolvimento de pântulas micropropagadas. **Dissertação** (Mestrado em Ciências Agrárias) Universidade Federal da Bahia. Cruz das Almas, Bahia. 76f.

SOARES, T.M.; MEISSNER FILHO, P.E.; ROCHA, H.S. Efeitos do vírus das estrias da bananeira na cultivar Caipira (AAA). In: Congresso Brasileiro de Fruticultura, 16., 2000, Fortaleza. **Actas**. Fortaleza: Sociedade Brasileira de Fruticultura, 2000. 1 CD-ROM.

SOFFNER, M. L.A.P. 2001. Produção de polpa celulósica a partir do engaço da bananeira. **Dissertação de mestrado**. Piracicaba, SP.

STAGINNUS, C; RICHERT-PÖGGELER, K.R. 2006. Endogenous pararetroviruses: twofaced travelers in the plant genome. **Trends in Plant Sciences**, v.11, n.10, p.485-491.

STEVENS, W. A. 1983. **Virology of flowering plants**. New York: Chapman and Hall. 183 p. (Tertiary level biology).

SU, H-J. 1999. Advancing Banana and Plantain R & D in Asia and the Pacific. **INIBAP**.

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

THOMAS, J.E. Viruses of Banana and Methods for Their Detection. 1998. Managing banana and citrus diseases. **INIPAB**.

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

TRINDADE et al, 1998. In: PAZ LIMA, M.L. Estudos em doenças de plantas. Disponível em:<http://www.fitopatologia1.blogspot.com>., acessado em 01 de abril de 2011.

TSAO, L.Y. 1998. Biological and Molecular Characterization of Banana Bunchy Top Virus Strains and Their Ecology. Unpub. Ph.D. **Thesis**, Graduate Institute of Plant Pathology and Entomology, National Taiwan University, Taiwan, ROC. 132 pp.

TUSHMEREIRWE, W.K.; KARAMURA, E.B.; KARYEIJIA, R. 1996. Banana streak virus (BSV) and an associated filamentous virus (unidentified) disease complex of highland bananas in Uganda. *Info Musa* 5: 9–12. In: PIETERSEN, G. & THOMAS, J.E. Overview of Musa virus diseases. Plant virology in sub-Saharan Africa.

VAN DEN BERG, N. 2006. Identification of genes associated with tolerance in the Cavendish Banana selection, GCTCV-218, against *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense, subtropical race 4. **Tese de Doutorado em Plant Pathology**. University of Pretoria, Faculty of Natural and Agricultural Sciences, Pretoria.

VAN REGENMORTEL, M.H.V. et al. 2000. Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses: Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. In: FIGUEIREDO, D.V.; MEISSNER FILHO, P.E.; SILVA NETO S.P.; BRIOSSO, P.S.T. 2006. Detection and analysis of *Banana streak virus* (BSV) sequences variability of banana from Brazil. *Summa Phytopathologica*, v.32, n. 2, p. 118-123.

WAHYUNI, W.S.; DIETZGEN, R.G.; HANADA, K.; FRANCKI, R.I.B. 1992. Serological and biological variation between and within subgroup-1 and subgroup-II strains of Cucumber mosaic virus. **Plant Physiol** 41:282–297.

WANG, D-H.; WANG, B-C.; LI B.; DUAN, C-R.; ZHANG, J. 2004. Extraction of total RNA from *Chrysanthemum* containing high levels of phenolic and carbohydrates. **Colloid Surface B** 36: 111–114.

WANG, T.; ZHANG, N. & DU, L. 2005. Isolation of RNA of high quality and yield from *Ginkgo biloba* leaves. **Biotechnology Letters** 27:629–633

WANG, X-X.; BO WANG; LIU, L-J.; CUI, X-P.; YANG, J-Y.; WANG, H.; JIANG, H.; LUO, B-B.; ZHU LONG; DOU, W-X.; ZHANG, N.; PENG, D-X. 2010. Isolation of high quality RNA and construction of a suppression subtractive hybridization library from ramie (*Boehmeria nivea* L. Gaud.) **Molecular Biology Reports** 37:2099–2103.

WETZEL, T.; CANDRESSE, T.; MACQUARIE, G.; RAVELONANDRO, M.; DUNEZ, J. 1992 - A highly sensitive immunocapture polymerase chain reaction method for plum pox potyvirus detection. **Journal of Virological Methods** 39:27-37.

WILLIAMS, D.J.; WILLINK, M.C.G. 1992. Mealybugs of Central and South America. In: Morandi Filho, W. J. Cochonilhas-farinhas associadas à videira na Serra Gaúcha, bioecologia e controle de *Planococcus citri* (Risso,1813) (Hemiptera: Pseudococcidae). Tese de doutorado.Universidade Federal de Pelotas, 2008.

WOOD, K.R. & COUTTS, R.H.A. (1975) preliminary studies on RNA components of 3 strains of Cucumber mosaic virus. In: CHOU,C-N; CHEN, C-E; WU, M-L; SU, H-J e YEH, H-H. Biological and Molecular Characterization of Taiwanese Isolates of Cucumber mosaic virus Associated with Banana Mosaic Disease. *J. Phytopathology* 157, 85–93 (2009).

WU, R-Y. & SU, H-J. 1990. Production of monoclonal antibodies against banana bunchy top virus and their use in enzymelinked immunosorbent assay. **Journal of Phytopathology** , 128: 203-208.

WYLIE, S.; WILSON, C.R.; JONES, R.A.C. & JONES, M.G.K. 1993. A polymerase chain reaction assay for Cucumber mosaic virus in lupin seeds. **Australian Journal Agriculture of Research**, Melbourne, v. 44, nº 1, p.41-51.

XU, Q.; WEN, X.; TAO, N.; HU, Z.; YUE, H.; DENG, X. 2006. Extraction of high quality of RNA and construction of a suppression subtractive hybridization (SSH) library from chestnut rose (*Rosa roxburghii* Tratt). **Biotechnology Letters** 28:587–59

ZERBINI JR., F. M.; CARVALHO, M. G. de; ZAMBILOM, E. M. 2006. **Introdução à virologia vegetal**. Editora UFV. Viçosa. 145p.