

PCR *multiplex* para a detecção de BSV e CMV em bananeiras micropropagadas

Daniel Vasquez Figueiredo¹ & Paulo Sergio Torres Brioso¹

¹Laboratório de Virologia Vegetal e Viróides / DEF / IB / UFRRJ, Caixa Postal 74585, CEP 23851-970, Seropédica, RJ, e-mail: brioso@bighost.com.br. Bolsistas do CNPq

Autor para correspondência: Paulo Sergio Torres Brioso

Data de chegada: 16/11/2004. Aceito para publicação em 03/02/2007.

1144

RESUMO

Figueiredo, D. V. & Brioso, P. S. T. PCR *multiplex* para a detecção do BSV e do CMV em bananeiras micropropagadas. *Summa Phytopathologica*, v.33, n.3, p.229-232, 2007.

Um protocolo de PCR *multiplex* foi estabelecido para a detecção do *Banana streak virus* (BSV) e do *Cucumber mosaic virus* (CMV) em bananeiras micropropagadas. Estes vírus são responsáveis por perdas na produção de bananas em todo o mundo. Alguns trabalhos descrevem a integração do BSV no genoma B da bananeira. Contudo, a existência de bananeiras híbridas livres do BSV tem sido demonstrada. Ademais, determinadas estirpes do CMV não são transmitidas mecanicamente sob condições de laboratório, nem tampouco detectadas por testes sorológicos. Como consequência, a indexação de matrizes para cultura de tecido algumas vezes se mostra ineficiente. A metodologia

apresentada neste trabalho sobrepuja esta dificuldade, pois se baseia na detecção do ácido nucléico viral presente em amostras foliares de bananeira. Na reação, foram usados os oligonucleotídeos BADNA 1A e BADNA 4, para a detecção do BSV, e “CMV senso” e “CMV antisenso” para a detecção do CMV. Após a eletroforese foi verificada a presença de dois fragmentos de DNA amplificados simultaneamente, um dos quais com 597 pb correspondente ao BSV e o outro, com 488 pb, correspondente ao CMV. Este resultado indica que o PCR *multiplex* pode ser utilizado como uma ferramenta adicional na indexação do BSV e do CMV em bananeiras propagadas por cultura de tecido.

Palavras-chave adicionais: *Musa* spp., PCR *multiplex*, BSV e CMV.

ABSTRACT

Figueiredo, D. V. & Brioso, P. S. T. Multiplex PCR for detection of *Banana streak virus* and *Cucumber mosaic virus* from micropropagated banana. *Summa Phytopathologica*, v.33, n.3, p.229-232, 2007.

A protocol for multiplex PCR assay was established to detect both *Banana streak virus* (BSV) and *Cucumber mosaic virus* (CMV) in micropropagated banana cultivars. These viruses are responsible for losses in banana production worldwide. Previous reports have described the integration of BSV in banana genome B. However, the existence of hybrid BSV-free banana cultivars has been reported. Moreover, there have been reports that some CMV strains cannot be mechanically transmitted under laboratory conditions and are not always detected by serological assays. Therefore, the selection of virus-free mother plants for tissue culture is sometimes unsuccessful.

The methodology presented in this work overcomes this drawback because it is based on the detection of viral nucleic acids in banana leaf samples. Primers BADNA 1A and BADNA 4 were used to BSV detection, and primers “CMV sense” and “CMV antisense” were adopted to CMV detection. The simultaneous amplification of two different sized amplicons was obtained. Following electrophoresis, a 597 pb fragment correlated with BSV and a 488 fragment correlated with CMV were detected. This assay is an additional tool which should be used to confirm the virus-free status of the mother plants propagated through tissue culture.

Additional keywords: *Musa* spp., multiplex PCR, BSV, CMV.

A bananeira (*Musa* spp.) é uma das fruteiras mais cultivada nos países de clima tropical e subtropical (18). Seus frutos representam a quarta mercadoria mais importante comercializada no mundo e em muitas áreas são considerados o principal produto alimentício (2). Em 2004, a produção brasileira atingiu 6,6 milhões de toneladas, enquadrando nosso país como um dos maiores produtores mundiais (www.faostat.fao.org).

Na evolução das bananeiras comestíveis participaram, principalmente, as espécies diplóides selvagens *M. acuminata* Colla e *M. balbisiana* Colla, de modo que cada cultivar pode conter combinações variadas de genoma completo dessas espécies (1). 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) (1).

As bananeiras comerciais são estéreis e, portanto, propagadas vegetativamente. Tradicionalmente, isto é feito por meio de mudas, mas a partir da última década, a cultura de tecidos tem sido adotada e assim, germoplasma de bananeira é distribuído internacionalmente (20).

Entretanto, como em outras culturas, problemas fitossanitários acompanham a bananicultura. As doenças ocasionadas por vírus merecem atenção especial. Os vírus podem ser transmitidos por insetos vetores e através da propagação vegetativa, o que pode ocasionar uma ameaça à produção, tanto nas áreas onde os vírus

são endêmicos, quanto naquelas livres de vírus, mas que recebem novas mudas (20). Até o momento, somente o *Banana streak virus* (BSV) e o *Cucumber mosaic virus* (CMV) foram registrados em bananeiras cultivadas no Brasil (8, 17).

As bananeiras podem ser infectadas por mais de um vírus ao mesmo tempo (6). Estudos demonstraram que bananeiras infectadas com o BSV apresentam sintomas que podem ser muitas vezes confundidos com aqueles causados pelo CMV, sendo deste modo indistinguíveis os sintomas causados pela dupla infecção destes vírus (22).

O BSV pertence ao gênero *Badnavirus*, as partículas virais são baciliformes, sem envelope, medindo de 120 a 150 nm de comprimento por 23 a 30 nm de diâmetro, contendo um dsDNA circular de aproximadamente 7,4 kpb (23). Possui uma faixa restrita de hospedeiras distribuídas entre diferentes cultivares de bananeira, de plátano e, experimentalmente, de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) (6, 16). Apresenta várias estirpes que podem ser identificadas através de diferenças na patogenicidade e na sintomatologia em cultivares de bananeira e cana-de-açúcar e, através de testes sorológicos e moleculares (16). O vírus pode ser disseminado na natureza pelas cochonilhas *Planococcus citri* Russo e *Saccharicoccus sacchari* Ckll (Homoptera: Pseudococcidae) ou transmitido pelo rizoma da planta (6). Os vegetais infectados podem apresentar sintomas de estrias foliares, lesões foliares cloróticas, mosaico, má formação dos frutos e diminuição do cacho. Os sintomas de estria e de mosaico ocorrem esporadicamente durante o ano, dificultando sua identificação visual (16). Ademais, o BSV apresenta um alto grau de heterogeneidade genômica e sorológica, entre seus isolados (9, 16). Tal heterogeneidade impõe uma séria restrição quanto à utilização de técnicas sorológicas e moleculares para a sua detecção em germoplasma de *Musa*.

Já o CMV pertence ao gênero *Cucumovirus*, apresenta distribuição cosmopolita e diferentes graus de virulência. As partículas virais são isométricas, com 28 a 30 nm de diâmetro, contendo ssRNA tripartido (23). Pode ser transmitido na natureza por várias espécies de afídios, apresentando com estes uma relação do tipo não persistente (4). As plantas de bananeiras enfermas podem apresentar sintomas de necrose vascular, espessamento intermitente da nervura, separação da bainha foliar externa do pseudocaule, clorose, mosaico, nanismo, má formação dos frutos e, às vezes, morte do vegetal. O sintoma de mosaico é melhor visualizado na estação fria (4).

Em vista dos problemas fitossanitários causados por estes vírus, um crescente comércio de plântulas de bananeira micropropagadas tem se estabelecido visando a limpeza clonal das cultivares de maior interesse econômico (21). Entretanto, relatos revelam a possibilidade de seqüências do BSV integrarem-se no genoma de *Musa* sp., e que a cultura de tecido possa ser um gatilho de infecção epissomal do vírus, visto que altos títulos do BSV em progênies micropropagadas de matrizes assintomáticas puderam ser obtidos (11, 12, 13, 19). Ademais, o teste mais utilizado em escala comercial na diagnose viral em bananeira (micropropagada ou não) é o ELISA, e o mesmo se restringe ao CMV (7). Isso possibilita um escape na detecção de mudas infectadas com outros vírus ou com estirpes virais do CMV que não são detectadas em testes sorológicos (4, 24).

O objetivo deste trabalho consiste no desenvolvimento de um protocolo de PCR *multiplex* para a detecção simultânea do BSV e do CMV, em bananeiras micropropagadas e cultivadas no Brasil.

Material Vegetal

Amostras foliares de plântulas de bananeiras provenientes de cultura de tecido foram utilizadas neste trabalho. Dentre estas foram testadas seis amostras da cultivar Pacovan (AAB) e uma da cultivar Prata Graúda (AAAB). Para controle positivo do teste foi utilizada a cultivar Prata Anã (AAB) apresentando infecção mista.

Extração dos ácidos nucléicos totais de bananeira

Na purificação do DNA total das amostras foliares foi utilizado o produto DNAzol (Invitrogen), e a metodologia do processo foi realizada conforme a recomendação do fabricante. A extração do RNA total foi realizada segundo a metodologia descrita por Hu *et al.* (15).

Reação de transcrição reversa

A reação de transcrição reversa foi preparada segundo Briosio (5), no qual em um volume final de 20 µl foram adicionados 12 ml de água tratada com DEPC, 4 µl de 5 X tampão da enzima transcriptase reversa, 2 µl de mistura 2,5 mM de dNTPs, 50 pmoles do oligonucleotídeo “CMV antisenso” (3), 1 ml de RNA total e 100 U da enzima transcriptase reversa (“Superscript II” – Invitrogen). A mistura foi incubada a 37°C por uma hora, 94°C por cinco minutos e resfriada no gelo.

PCR *multiplex*

Foram adicionados em um tubo de polipropileno de 0,2 ml, 5 µl de tampão 10X PCR da enzima *Taq* DNA polimerase, 3 µl da mistura 2,5 mM de dNTP, 50 pmoles dos oligonucleotídeos “BADNA 1A” e “BADNA 4” (14), e 12,5 pmoles dos oligonucleotídeos “CMV senso” e “CMV antisenso” (3), 2 µl de MgCl₂ 50 mM, 1,25 U DNA polimerase (*Taq* DNA polimerase, Invitrogen), 2 µl do produto de reação da transcrição reversa (cDNA), 2 µl de DNA total de bananeira e água deionizada estéril para 50 µl de volume final. O tubo foi submetido a PCR (reação em cadeia da polimerase) no termociclador programável PTC-200 (MJ RESEARCH), nas seguintes condições: um ciclo inicial de desnaturação de 94°C / 2 min., seguido de 30 ciclos de 94°C / 15 seg., 52°C / 30 seg., 72°C / 1 min. e extensão final de 72°C / 5 min.

Os produtos amplificados foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1,0 % (p/v), contendo brometo de etídio (0,25 µg / ml) e visualizados sob luz ultravioleta (UV). Como padrão de massa molecular foi adotado o 1 kb DNA “Ladder” (Invitrogen).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com a metodologia empregada foi possível diagnosticar a presença do BSV e do CMV nas amostras analisadas. Após a eletroforese verificou-se a presença de dois fragmentos de DNA amplificados simultaneamente: um com 597 pb correspondente ao BSV e outro com 488 pb, correspondente ao CMV (Figura 1). Dentre as amostras de cultura de tecidos analisadas, as seis amostras ‘Pacovan’ (AAB) e o controle positivo, Prata Anã (AAB), apresentaram infecção mista do BSV com o CMV. Entretanto, a cultivar Prata Graúda (AAAB) se mostrou livre do BSV. Este resultado reforça os dados encontrados por Figueiredo *et al.* (10), que demonstram a existência de bananeiras híbridas livres de BSV, e indica que o PCR *multiplex* pode ser utilizado na indexação do BSV e do CMV em bananeiras propagadas por cultura de tecido.

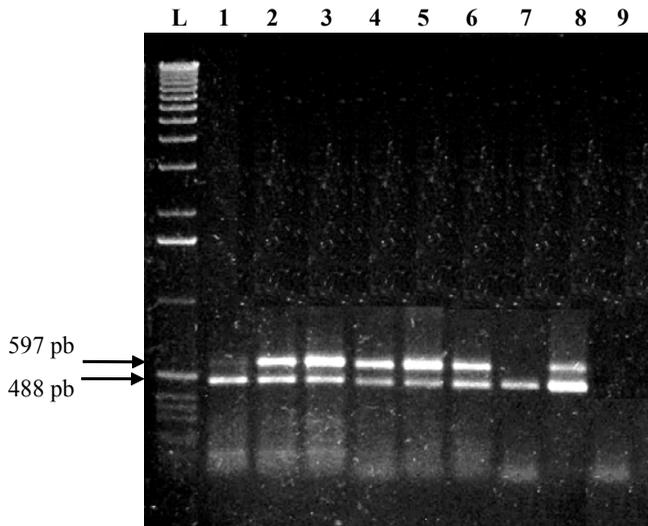


Figura 1. Fragmentos do genoma do *Banana streak virus* (597 pb) e *Cucumber mosaic virus* (488 pb). Estes fragmentos foram amplificados simultaneamente, a partir de amostras foliares de bananeiras cultivadas *in vitro*. Linhas de 1 a 6: 'Pacovan' AAB; linha 7: 'Prata Graúda' AAAB; linha 8: 'Prata Anã' AAB (controle positivo); linha 9: Controle negativo (sem ácido nucléico); L: Marcador de massa molecular 1 kb DNA "Ladder".

Atualmente, a cultura de tecidos tem sido adotada em programas de melhoramento para a propagação da bananeira em escala comercial. A erradicação de vírus de bananeira por meio da cultura de meristema associada à termoterapia, quimioterapia e crioterapia tem sido relatada (21). Entretanto, nas amostras provenientes de cultura de tecidos analisadas, foram constatados tanto o BSV quanto o CMV, o que revela que a cultura de tecidos quando empregada visando a limpeza clonal de bananeira se mostra em alguns casos ineficiente. Desta forma, a metodologia de diagnóstico apresentada neste trabalho poderia ser aliada a limpeza viral, visando não somente indexar matrizes, mas também verificar a presença dos vírus nas plantas propagadas.

Recentes relatos sugerem que todas as bananeiras híbridas estariam potencialmente infectadas com o BSV, pois um complexo BSV integrante denominado EPRV ("endogenous pararetrovirus sequence") presente no genoma B da bananeira seria capaz de originar infecção epissomal, quando a planta é submetida à cultura de tecidos (11, 12, 13, 19). Contudo, recentes resultados obtidos pelo nosso grupo de pesquisa demonstraram a existência de bananeiras híbridas livres de BSV, sugerindo que há possibilidade de que matrizes livres de BSV ainda sejam encontradas (10).

O CMV está amplamente distribuído no território nacional (17). No país, o teste mais utilizado em escala comercial na diagnose deste vírus em bananeira, micropropagada ou não, é o ELISA (7, 8). Porém, determinadas estirpes do CMV não são transmitidas mecanicamente para plantas indicadoras, nem tampouco detectadas por ELISA (4, 24). A metodologia apresentada neste trabalho sobrepõe esta dificuldade, pois se baseia na detecção do ácido nucléico viral presente em amostras foliares de bananeira.

O panorama atual da cultura da banana no Brasil e no mundo revela a necessidade de medidas preventivas de controle. O desenvolvimento de uma metodologia de indexação eficiente, sensível e rápida, permitiria a pronta identificação de cultivares infectadas com estirpes virais já existentes no território nacional, impedindo o escape e o trânsito de mudas infectadas provenientes ou não de cultura de tecido. Conseqüentemente, tal medida diminuiria a possibilidade de perdas na produtividade da cultura da bananeira em função de infecção viral simples ou mista.

- Alves, E.J. A cultura da bananeira: aspectos técnicos, socio-econômicos e agro-industriais. Brasília: Ministério da Agricultura e do Abastecimento / Embrapa / Centro Nacional de Pesquisa de Mandioca e Fruticultura EMBRAPA/CNPMPF, 1997, p. 585.
- INTERNATIONAL Network for the Improvement of Banana and Plantain. **Annual Report of International Network for the Improvement of Banana and Plantain**, Montpellier, p.29-33, 1992.
- Bariana, H.S.; Shannon, A.L.; Chu, P.W.G.; Waterhouse, P.M. Detection of five seedborne legume viruses in one sensitive multiplex polymerase chain reaction test. **Phytopathology**, v. 84, p. 1201-1205, 1994.
- Brioso, P.S.T. **Identificação do vírus do mosaico do pepino, nas áreas de cultivo de bananeira e plátano, em Costa Rica**. 1986. 38f.
- Brioso, P.S.T. **Caracterização viral, detecção de vírus vegetais e identificação de fonte de resistência**. 1995. 245f. Tese (Doutorado em Ciências) – Departamento de Genética, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.
- Brioso, P.S.T.; Cordeiro, Z.J.M.; Rezende, J.A.M.; Kitajima, E.W.; Pimentel J.P.; Figueiredo, A.R. Infecção mista em bananeiras pelos vírus do mosaico do pepino ("*Cucumber mosaic virus*" – CMV) e da risca da bananeira ("*Banana streak virus*" – BSV) no Brasil. **Summa Phytopathologica**, Jaboticabal, v.26, n.2, p.257-259, 2000.
- Brioso, P.S.T.; Pozzer, L.; Montano, H.G.; Pimentel, J.P. Uso atual e futuro da biologia molecular na fitopatologia. Parte I – Aplicações em fitopatógenos e vetores. In: Luz, W.C.; Fernandes, J.M.C.; Prestes, A.M.; Picinini, E.C. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v.9, p.79-118, 2001
- Brioso, P.S.T. Detecção e controle dos vírus das estrias e do mosaico da bananeira. In: V Simpósio brasileiro sobre bananicultura, 1., 2003, Paracatu. **Anais**. Cruz das Almas: Nova Civilização, 2003. p.94-100.
- Dahal, G.; Pasberg-Gauhl, C.; Gauhl, F.; Thottappilly, G.; D'a Hughes, J. Studies on a Nigerian isolate of *Banana streak badnavirus*: II. Effect of intraplant variation on virus accumulation and reliability of diagnosis by ELISA. **Annals of Applied Biology**, London, v.132, n. 2, p.263-275, 1998.
- Figueiredo, D.V.; Meissner Filho, P.E.; Silva-Neto, S.P.; Brioso, P.S.T. Detecção e análise da variabilidade de seqüências do *Banana streak virus* (BSV) em bananeiras no Brasil. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v.32, n.2, p.118-123, 2006.
- Geering, A.D.W.; Olszewski, N.E.; Dahal, G.; Thomas, J.E.; Lockhart, B.E.L. Analysis of the distribution and structure of integrated *Banana streak virus* DNA in a range of *Musa* cultivars. **Molecular Plant Pathology**, Bristol, v.2, n. 4, p.207-213, 2001.
- Harper, G.; Hull, R. Cloning and sequence analysis of *Banana streak virus* DNA. **Virus Genes**, Norwell, v.17, n.3, p.271-278, 1998.
- Harper, G.; Osuji, J.O.; Heslop-Harrison, P.; Hull, R. Integration of *Banana streak badnavirus* into the *Musa* genome: molecular and cytogenetic evidence. **Virology**, San Diego, v.255, n.2, p.207-213, 1999.
- Harper, G.; Hart, D.; Moul, S.; Hull, R. Detection of *Banana streak virus* in field samples of bananas from Uganda. **Annals of Applied Biology**, London, v.141, n. 3, p.247-257, 2002
- Hu, J.S.; Li, H.P.; Barry, K.; Wang, M.; Jordan, R. Comparison of dot blot, ELISA, and RT-PCR assays for detection of two *Cucumber mosaic virus* isolates infecting banana in Hawaii. **Plant Disease**, Saint Paul, v.79, p.902-906, 1995.
- 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.

17. Meissner Filho, P.E. & Brioso P.S.T. **Frutas do Brasil**. Banana fitossanidade. Doenças causadas por vírus. Brasília. Embrapa. 2000. p.78-81.
18. Moreira, R.S. **Banana teoria e prática de cultivo**. 2.ed. Campinas: Fundação Cargill, 1999. 1 CD-ROM.
19. Ndownora, T.; Dahal, G.; Lafleur, D.; Harper, G., Hull, R.; Olszewski, N.E.; Lockhart, B. Evidence that *Badnavirus* infection *Musa* can originate from integrated pararetroviral sequences. **Virology**, San Diego, v.255, n.2, p.214-220. 1999.
20. Sharman, M.; Thomas, J.E.; Dietzgen R.G. 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, 2000.
21. Silva-Neto, S. P. Micropropagação e controle de viroses. In: V Simpósio Brasileiro Sobre Bananicultura, 1., 2003, Paracatu. **Anais**. Cruz das Almas: Nova Civilização, 2003. p.85-93.
22. Rodoni, B.C.; Ahlawat, Y.S.; Varma, A.; Dale, J.L.; Hardingr, M. Identification and characterization of *Banana bract mosaic virus* in India. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 81, n. 6, p. 669-672, 1997.
23. Van Regenmortel, M.H.V.; Fauquet, C.M.; Bishop, D.H.L.; Carstens, E.B.; Estes, M.K.; Lemon, S.M.; Maniloff, J.; Mayo, M.A.; McGeoch D.J.; Pringle, C.R.; Wickner, R.B. **Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses: Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses**. San Diego: Academic Press, 2000. p.1167.
24. Yot-Dauthy, D.; Bové, J.M. Mosaïque du bananier. Purification et identification de diverses souches du virus. **Fruits**, Montpellier, v.21, p.449-465, 1966.