



UNIVERSIDADE FEDERAL DE LAVRAS

**DIVERGÊNCIA GENÉTICA ENTRE CULTIVARES E CERTIFICAÇÃO  
GENÉTICA E FITOSSANITÁRIA DE MATRIZES DE BANANEIRA**

**GUILHERME AUGUSTO CANELLA GOMES**

2002

**GUILHERME AUGUSTO CANELLA GOMES**

**DIVERGÊNCIA GENÉTICA ENTRE CULTIVARES E CERTIFICAÇÃO  
GENÉTICA E FITOSSANITÁRIA DE MATRIZES DE BANANEIRA**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Agronomia, área de concentração Fitotecnia, para obtenção do título de "Doutor".

**Orientador**

Prof. Renato Paiva, PhD

**LAVRAS**

**MINAS GERAIS – BRASIL**

**2002**



**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da  
Biblioteca Central da UFLA**

**Gomes, Guilherme Augusto Canella**

**Divergência genética entre cultivares e certificação genética e fitossanitária  
de matrizes de bananeiras / Guilherme Augusto Canella Gomes. – Lavras :  
UFLA, 2002.**

**124 p. : il.**

**Orientador: Renato Paiya.**

**Tese (Doutorado) – UFLA.**

**Bibliografia.**

**1. Banana. 2. Divergência genética. 3. CMV. 4. Certificação de muda. 5. RT-PCR. 6. Hibridação molecular. 7. ELISA. 8. RAPD I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.**

**CDD-634.7723**

**-634.77235**

**GUILHERME AUGUSTO CANELLA GOMES**

**DIVERGÊNCIA GENÉTICA ENTRE CULTIVARES E CERTIFICAÇÃO  
GENÉTICA E FITOSSANITÁRIA DE MATRIZES DE BANANEIRA**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Agronomia, área de concentração Fitotecnia, para obtenção do título de “Doutor”.

Aprovada em 25 de fevereiro de 2002

Pesq. Edilson Paiva, PhD	EMBRAPA Milho e Sorgo
Pesq. Dra. Claudia Teixeira Guimarães	EMBRAPA Milho e Sorgo
Prof. Dr. Moacir Pasqual	UFLA
Prof. Dr. Luciano Vilela Paiva	UFLA



Prof. Renato Paiva, PhD  
UFLA  
(Orientador)

**LAVRAS  
MINAS GERAIS – BRASIL**

**"É daquelas frutas brasileiras de produção e consumo grandes, mas cujos padrões de rendimento e qualidade ainda estão por crescer e amadurecer. Capricho maior pode dar mais lucros ao produtor".**

**Anuário Agrícola, 1999.**

**Aos meus pais, Sebastião e Maria do Carmo, ao meu irmão Paulo, a minha avó "Quinhã", avô "Alemão" e avó Gessa, tia Márcia, D. Leila e para minha amada Aninha,**

**OFEREÇO**

**"Que esta seja a primeira de muitas..."**

**Ao amigo Renato Paiva,**

**DEDICO**

## AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Lavras, pela oportunidade concedida para a realização do curso de doutorado;

À Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior CAPES, pela concessão da bolsa de estudos;

Ao Núcleo de Biologia Aplicada da EMBRAPA Milho e Sorgo, pela infraestrutura disponibilizada para a execução dos trabalhos;

A Multiplanta Tecnologia Vegetal, pela parceria e visão de futuro;

Aos meus co-orientadores Claudia Teixeira Guimarães, Newton Portilho Carneiro, Elizabeth de Oliveira, pelas sugestões e apoio durante o decorrer dos trabalhos e em especial a Edilson Paiva, pelos conselhos e “puxões de orelha”;

Aos professores do Curso de Pós-Graduação, em especial ao prof. Ramirez pelos conhecimentos transmitidos sobre a cultura da bananeira;

Um agradecimento muito especial ao “Tio Miguel”, pela ajuda e grande amizade;

Ao pesquisador Lair (EPAMIG – Lavras), pelas cultivares cedidas;

Aos amigos do Núcleo de Biologia Aplicada da EMBRAPA Milho e Sorgo: Faustinho, Bruno, Gilson, Charles “Samanba’s”, Cris, Lilian, Anderson, Alcione, Rose, Bira, “Seu Eduardo Trovão” e Edna, pela amizade e companheirismo.

A todos que estiveram presentes e contribuíram, de alguma forma, para a realização deste trabalho.

## SUMÁRIO

RESUMO.....	i
ABSTRACT.....	iii
1. Introdução Geral.....	01
2. Referencial Teórico.....	02
2.1 Bananeira : origem, botânica, evolução, taxonomia e cultivares.....	02
2.2 Produção e Certificação de mudas de bananeiras.....	08
2.3 Marcadores Moleculares RAPD e Divergência Genética.....	10
2.4 Vírus do Mosaico das Cucurbitáceas (CMV).....	18
2.5 Métodos de Detecção de Vírus.....	21
3. Referências Bibliográficas.....	27
<b>CAPÍTULO I. Certificação genética de matrizes e mudas micropropagadas e estudo da divergência genética entre cultivares de bananeira por meio de marcadores RAPD .....</b>	<b>39</b>
RESUMO.....	39
ABSTRACT.....	40
1. Introdução.....	41
2. Material e Métodos.....	42
2.1 EXPERIMENTO I. Estudo da divergência genética entre cultivares de bananeira por meio de marcadores RAPD .....	42
2.1.1 Cultivares analisadas.....	42
2.1.2 Extração e quantificação do DNA genômico.....	43
2.1.3 Amplificação via RAPD.....	43
2.1.4 Avaliação dos dados moleculares.....	44
2.2 EXPERIMENTO II. Diferenciação de cultivares de banana utilizando marcadores RAPD.....	45

2.3 EXPERIMENTO III. Certificação genética de mudas micropropagadas de bananeira utilizando marcadores RAPD: Estudo de Caso.....	46
2.3.1 Estudo de Caso I. Confirmação de contaminação genética pela cv. Prata Anã em um lote de meristemas isolados da cv. Maçã.....	46
2.3.2. Estudo de Caso II. Certificação da identidade genética de 40 amostras de folhas de bananeiras.....	47
3.1 Resultado e Discussão.....	47
3.1 EXPERIMENTO I. Divergência genética entre cultivares de bananeiras por meio de marcadores RAPD.....	47
3.2 EXPERIMENTO II. Diferenciação de cultivares de banana utilizando marcadores RAPD.....	56
3.3 EXPERIMENTO III. Certificação genética de mudas micropropagadas de bananeiras utilizando marcadores RAPD: Estudo de Caso.....	64
3.3.1 Estudo de Caso I. Confirmação de contaminação genética pela cv. Prata Anã em um lote de meristemas isolados da cv. Maçã.....	64
3.3.2 Estudo de Caso II. Certificação da identidade genética de 40 amostras de folhas de bananeiras.....	66
4. Conclusões.....	69
5. Referências Bibliográficas.....	69
CAPÍTULO II. Certificação fitossanitária de matrizes de bananeira através de RT-PCR, Dot-Blot e ELISA .....	72
RESUMO.....	72
ABSTRACT.....	74
1. Introdução.....	75
2. Material e Métodos.....	76
2.1 Teste RT – PCR.....	76



2.2 Teste via Hibridação Molecular (“Dot-Blot”).....	78
2.3 Teste ELISA.....	81
2.4 EXPERIMENTO I. Comparação da sensibilidade e eficiência dos três testes de diagnose para o CMV.....	82
2.5 EXPERIMENTO II. Análise de 52 amostras de folhas de bananeira pelos três testes de detecção do CMV e padronização do local de amostragem na folha e das condições de armazenamento dos materiais vegetais coletados para análises.....	83
3. Resultados e Discussão.....	89
3.1 EXPERIMENTO I. Comparação da sensibilidade e eficiência dos três testes de diagnose para o CMV.....	89
3.2 EXPERIMENTO II. Análise de 52 amostras de folhas de bananeira pelos três testes de detecção do CMV e padronização do local de amostragem na folha e das condições de armazenamento dos materiais vegetais coletados para análises.....	99
4. Conclusões.....	112
5. Referências Bibliográficas.....	112
6. Anexos .....	115

## RESUMO

Gomes, G. A. C. **Divergência genética entre cultivares e certificação genética e fitossanitária de matrizes de bananeira.** Lavras: UFLA, 2002. 127 p. (Tese de Doutorado em Agronomia).

Na atualidade, uma das maiores preocupações dos técnicos ligados à bananicultura se refere ao material propagativo que vem sendo utilizado na implantação de novos bananais. Aspectos genéticos e fitossanitários desses materiais são frequentemente questionados pelos técnicos. Visando responder algumas dessas questões, foi estabelecida uma parceria entre a Universidade Federal de Lavras, EMBRAPA Milho e Sorgo e a Multiplanta Tecnologia Vegetal. Desta união, resultou um estudo de divergência genética entre 19 cultivares estudadas e algumas alternativas que possibilitarão um controle genético e fitossanitário, mais eficiente das mudas micropropagadas de bananeiras. As distâncias genéticas, para o estudo de divergência genética, foram obtidas pela porcentagem de discordância entre as cultivares e a representação gráfica destas distâncias foi determinada através de um dendrograma (método UPGMA). Foram obtidos ainda, os valores de correlação por análise tipo Bootstrap e os valores de PIC para os primers utilizados. Verificou-se que os marcadores RAPD foram eficientes na separação das cultivares, de acordo com o seu grupo genômico. Através dos valores de correlação obtidos, verificou-se que a utilização de 108 bandas polimórficas foi suficiente para estabelecer as distâncias genéticas entre as cultivares em estudo, pois a partir de 58 bandas polimórficas não houve diferenças significativas nos valores das distâncias genéticas ou no agrupamento das cultivares no dendrograma. Os valores de PIC demonstraram o alto conteúdo informativo dos primer RAPD utilizados neste estudo. Através da utilização de 7<sup>6</sup> primers RAPD foi possível identificar todas as 19 cultivares apreciadas neste estudo. Portanto, os marcadores moleculares RAPD podem ser utilizados em programas de certificação genética de mudas de bananeiras. Foram realizadas comparações entre três métodos de diagnose para o CMV, visando verificar suas possíveis aplicabilidades em programas de certificação fitossanitária de mudas de bananeiras. Para a realização do teste ELISA foi adquirido o “Kit Direct ELISA CMV” da Agdia Company. Através da hibridação com uma sonda marcada com

---

Comitê Orientador: Renato Paiva-UFLA (Orientador), Edilson Paiva-EMBRAPA Milho e Sorgo, Elizabeth de Oliveira-EMBRAPA Milho e Sorgo e Newton Portilho Carneiro-EMBRAPA Milho e Sorgo.

a dois terços do gene da capa protéica do CMV foram realizados os testes Dot-Blot. Para a realização do teste RT-PCR foi necessário estabelecer metodologias

digoxigenina complementar para a extração de RNA total, transformação do RNA em cDNA e para a amplificação de um fragmento de 745pb através da utilização de primers específicos para a capa protéica do CMV. Nossos resultados mostraram que, as amostras que serão submetidas ao teste RT-PCR necessitam ser imediatamente armazenadas em nitrogênio líquido depois de retiradas da planta doadora. Para os testes Dot-Blot e ELISA, as amostras podem ser armazenadas em saco plástico contendo jornal úmido por até 10 dias. O local de coleta na folha não interfere nos resultados dos testes. Foi possível detectar a presença do CMV em extratos foliares ou RNAs armazenados por 4 meses a  $-80^{\circ}\text{C}$ . O testes RT-PCR, Dot-Blot e ELISA são suficientemente sensíveis para detectar a presença do plasmídeo clonado com o fragmento de cDNA correspondente a dois terços do gene da capa protéica do CMV em concentrações de até  $10\text{ fg}/\mu\text{L}$ ,  $100\text{ pg}/\mu\text{L}$  e  $100\text{ ng}/\mu\text{L}$ , respectivamente. O teste RT-PCR apresentou-se 1.000 vezes mais eficiente do que o teste Dot-Blot e 100.000 vezes mais do que o ELISA. Recomenda-se a aplicação do teste RT-PCR apenas nas matrizes doadoras de meristemas devido ao seu alto custo e alta complexidade.

## ABSTRACT

Gomes, G. A. C. Genetic divergence among cultivars and genetic and phytopatologic banana plant certification. Lavras: UFLA, 2002. 127p. (Doctorate Thesis in Agronomy).

One of the main concerns associated with the banana crop is the propagative material used during the implementation of new orchards. Genetic and phytopatologic aspects of these materials are frequently questioned by scientists. With the objective to answer some of these questions a scientific collaboration among Universidade Federal de Lavras, EMBRAPA Milho e Sorgo and Multiplanta Tecnologia Vegetal was established. From this consortium resulted a study of the divergence genetic of 19 cultivars and some alternatives that can permit a more efficient genetic and phytopatologic control of micropropagated banana plantlets. The genetic distances, for the genetic divergence study, were obtained by discordance percentage among cultivars and the distance graphic representation was determined by a dendrogram (UPGMA method). It was also obtained correlation values by Bootstrap analysis and PIC values for the used primers. It was verified that RAPD markers were efficient to separate cultivars, according to their genomic group. Based on the correlation values, the use of 108 polimorfic bands were sufficient to establish genetic distances among cultivars once that with the use of more than 58 polimorfic band, no significative differences in genetic distances values or in cultivars grouping in dendrogram were observed. The PIC values showed high informative content according to RAPD primers used. Using 7 RAPD primers it was possible to identify all the 19 cultivars evaluated in this work. Thus, the RAPD molecular markers can be used in programs of genetic certification of banana plantlets. Comparations among three methods of CMV diagnosis were performed with the objective to verify the possibility use in programs of phytopatogenic certification of banana plantlets. For the ELISA Test it was used a "Kit Direct ELISA CMV" from Agdia Company. By hibridizing a probe labeled with digoxigenin that overlap two third of CMV proteic coat gene, a Dot-Blot test was used. For the RT-PCR it was necessary to optimize methodologies for total RNA extraction, RNA transformation in cDNA and for 745 bp fragment amplification was used a set of primers specific for CMV proteic coat.

---

Guidance Committee: Renato Paiva-UFLA (Major Professor), Edilson Paiva-EMBRAPA Milho e Sorgo, Elizabeth de Oliveira-EMBRAPA Milho e Sorgo and Newton Portilho Carneiro-EMBRAPA Milho e Sorgo.

Our results showed that samples submitted to RT-PCR test need to be stored immediately in liquid nitrogen after mother plant. For Dot-Blot and ELISA tests, the samples were stored of plastic bag containing wet paper 10 days. Leaf plant position did not interfere in the test results. It was possible to detect CMV presence in leaf extracts or RNAs stored for 4 months at  $-80^{\circ}\text{C}$ . The RT-PCR test, Dot-Blot and ELISA are sensible enough to detect the cloned plasmid presence with the cDNA fragment correspondent to two third of CMV proteic coat gene in concentratioes 10 fg/ $\mu\text{L}$ , 100 pg/ $\mu\text{L}$  and 100 ng/ $\mu\text{L}$ , respectively. The RT-PCR test presented to be 1000 fold more efficient than Dot-Blot and 100.000 fold than ELISA. It is recommended the RT-PCR test only in meristem donor plants due the high cost and complexity.

## 1 INTRODUÇÃO GERAL

A bananeira é a frutífera tropical mais difundida no mundo, apresentando grandes áreas cultivadas e grande volume de comercialização. De toda a produção mundial de banana, da ordem de 56 milhões de toneladas anuais, o Brasil responde por cerca de 17%. A despeito do volume de produção, nossa participação no comércio mundial é mínima (1% das transações), enquanto o Equador se faz presente com 20% do total.

O nível técnico da cultura, entre nós, também é baixo, o que se expressa na produtividade de 15 t/ha contra 70 t/ha do Equador, Colômbia e nações da América Central. Esses países recebem cobertura e assistência técnica de especialistas de firmas importadoras ou de grandes companhias estrangeiras do setor de frutas.

Por sua vez, no Brasil, há uma “penca de obstáculos”, que impedem a melhoria da qualidade da banana nacional, fator de importância crescente e decisiva na conquista de mercados diferenciados, especialmente no exterior. Os entraves envolvem aspectos técnicos, políticos, sociais e econômicos.

Tecnologias que garantam a produção de banana de qualidade, com redução de perdas, devem abranger todas as etapas da cadeia produtiva, desde a produção de mudas de qualidade até a comercialização dos frutos.

Na produção comercial de frutas, deve-se dispor de grande quantidade de mudas com qualidade comprovada, de modo a garantir o sucesso do empreendimento. Para que haja garantia de uniformidade de material de implantação dos pomares, é necessária a regulamentação na produção de mudas.

Deve-se ressaltar que na atualidade, uma das maiores preocupações dos técnicos ligados à bananicultura se refere ao material propagativo que vem sendo utilizado na implantação de novos bananais. Aspectos genéticos e fitossanitários desses materiais são freqüentemente questionados pelos técnicos.

Visando a responder algumas dessas questões, foi estabelecida uma parceria entre a Universidade Federal de Lavras, EMBRAPA Milho e Sorgo e a Multiplanta Tecnologia Vegetal. Nesta união, buscaram algumas alternativas que possibilitarão um controle genético e fitossanitário mais eficiente das matrizes de bananeiras utilizadas para iniciar o processo de micropropagação.

Portanto, este trabalho teve por objetivo realizar um estudo da divergência genética entre cultivares, estabelecer uma metodologia para certificação genética de matrizes e mudas, além de comparar a eficiência e a sensibilidade de três testes de detecção para o CMV, objetivando suas aplicações em programas de certificação fitossanitária de matrizes de bananeiras.

## **2 REFERENCIAL TEÓRICO**

### **2.1 Bananeira : origem, botânica, evolução, taxonomia e cultivares**

A palavra banana é oriunda das línguas serra-leonesa e liberiana da costa ocidental da África. Apesar de não se precisar com exatidão sua origem admite-se que seja do oriente, sul da China ou Indochina. Há referências da sua presença na Índia, Malásia e Filipinas, onde tem sido cultivada há mais de 4.000 anos (Silva, 1998).

Conforme a sistemática botânica de classificação hierárquica, as bananeiras produtoras de frutos comestíveis são plantas monocotiledôneas, pertencentes à ordem Scitaminales, em que se inclui a sub-família Musoideae e o gênero *Musa*, sendo este constituído por quatro séries ou seções : *Australimusa*, *Callimusa*, *Rhodochlamys*, e (Eu-) *Musa* (Simmonds, 1973). A separação entre *Rhodochlamys* e (Eu-) *Musa* 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.

A classificação proposta por Cheesman (1948) para o gênero *Musa*, aceita atualmente em todo o mundo, baseia-se no número básico de cromossomos, que o divide em dois grupos: espécies com  $n = 10$ , que integram as seções *Australimusa* e *Callimusa*; e espécies com  $n = 11$  cromossomos, que integram as seções *Rhodochlamys* e (Eu-) *Musa*. As espécies componentes dessas duas últimas seções são as que apresentam potencial como germoplasma útil para programas de melhoramento genético das variedades cultivadas. Segundo Shepherd (1990), as espécies com este potencial são: a) seção *Rhodochlamys* : *M. ornata*, *M. velutina*, *M. laterita*, *M. rubra* e *M. sanguinea*; b) seção (Eu-) *Musa* : *M. acuminata*, *M. flaviflora*, *M. ochracea*, *M. schizocarpa*, *M. balabanensis* e *M. balbisiana*.

As cultivares apresentam três níveis cromossômicos distintos: diplóides, triplóides e tetraplóides, respectivamente com dois, três e quatro múltiplos do número básico de cromossomos. Por meio de cruzamentos experimentais pode-se constatar que as bananeiras triplóides originaram-se a partir de hibridações entre diplóides, bem como os tetraplóides foram gerados a partir de cruzamentos entre diplóides e triplóides (Cheesman, 1932 a, 1932 b; Dodds, 1943).

Na evolução das bananeiras comestíveis participaram, principalmente, as espécies diplóides selvagens *M. acuminata* e *M. balbisiana*, de modo que cada cultivar deve conter combinações variadas de genoma completos dessas espécies parentais. Esses genomas são denominados pelas letras A (*M. acuminata*) e B (*M. balbisiana*), de cujas combinações resultaram os grupos AA, BB, AB, AAA, AAB, ABB, AAAA, AAAB, AABB e ABBB (Simmonds & Shepherd, 1995).

A evolução das cultivares de bananeiras processou-se em quatro etapas, repetidas em várias épocas (Simmonds & Shepherd, 1995). A primeira etapa



constou da ocorrência de partenocarpia por mutação na espécie *M. acuminata* (AA), portanto as cultivares mais antigas eram diplóides do grupo AA. O número dessas cultivares pôde ser ampliado por meio de cruzamentos espontâneos entre si ou com outras formas selvagens da mesma espécie.

A segunda etapa caracterizou-se pela hibridação entre cultivares do grupo AA e plantas selvagens de *M. balbisiana* (BB), para produzir híbridos diplóides do grupo AB, atualmente raros e possivelmente limitados na sua origem à Índia.

A terceira e quarta etapas da evolução são admitidas baseando-se na capacidade de várias bananeiras e de alguns híbridos gerarem, em baixa frequência, uma proporção de células-ovo viáveis, sem meiose típica, com a mesma constituição cromossômica e genética da planta mãe, seja esta diplóide ou triplóide. Por meio de cruzamentos espontâneos, envolvendo pólenes das espécies parentais (*M. acuminata* e *M. balbisiana*) ou de cultivares do grupo AA, com genótipos dos grupos AA e AB, portadores de sacos embrionários diplóides, tornou-se possível a evolução de triplóides dos grupos AAA, AAB e ABB, pela adição do número básico de cromossomos X (A ou B). Da mesma forma, os tetraplóides dos grupos AAAA, AAAB, AABB e ABBB evoluíram a partir dos três grupos triplóides. Deve-se ressaltar que todos estes grupos foram constatados por avaliação taxonômica das cultivares exploradas em todo o mundo, à exceção do grupo AAAA, que só foi obtido por cruzamentos experimentais (Sherpherd, 1984).

☞ Existe no Brasil um grande número de bananeiras, muitas delas ainda não classificadas, bem como um grande número de sinónimas, o que dificulta em muito a identificação das mesmas. As cultivares poderiam ser divididas em vários grupos considerando-se por exemplo o número de cromossomos, forma de utilização, porte da planta, entre outros (Silva, 1998). Simmonds & Shepherd (1995) utilizaram duas características vegetativas e treze características de

inflorescência, todas diferenciais entre as espécies, embora existam algumas exceções, para a diferenciação das cultivares em grupos.

Na identificação de cultivares dentro dos grupos são conhecidas apenas as chaves publicadas por Simmonds (1973), que se refere, separadamente, às principais cultivares dos três grupos triplóides. Além disso, ainda não foi publicada uma lista de descritores universalmente aceita para a caracterização das cultivares, uma vez que a lista de Simmonds (1984) é incompleta e a lista francesa, também omite alguns descritores úteis.

No Brasil, os principais trabalhos visando a identificação das cultivares foram realizados por Alves et al. (1984); Moreira & Saes (1984); Shepherd et al. (1984); ITAL (1990); e Alves (1990). Mais recentemente, Paz (2000) utilizando marcadores RAPD realizou a caracterização de algumas cultivares comerciais. Portanto, até hoje não existe uma alternativa aos marcadores morfológicos para se identificar, com precisão, todas as cultivares de bananeiras. Por isso veremos abaixo que, a caracterização das espécies é feita segundo suas características fenotípicas. No entanto, estas características nem sempre são mantidas enquanto o indivíduo está no início da sua fase vegetativa, dificultando sua identificação (Alves, 1999).

As principais cultivares comerciais existentes no Brasil pertencem aos grupos AA, AAA, AAB, AAAB e ABB (Paz, 2000).

A cultivar Ouro do grupo AA, apresentam plantas normalmente delgadas, pseudocaulis com muitas manchas escuras, folhas eretas e estreitas e com a base do pecíolo aberto. Possui polpa branco - creme ou amarelo - ouro, perfumada e muito doce. No entanto, apresentam pequena importância comercial no Brasil. É pouco rústica e produz menos e menores frutos que as bananas triplóides (Alves, 1999).

Plantas normalmente vigorosas, com manchas escuras no pseudocaulis e ausência de antocianina nas flores masculinas, são características marcantes das

cultivares do grupo AAA. Neste grupo, enquadram-se os subgrupos Gros Michel e Cavendish.

No subgrupo Gros Michel destacam-se a Gros Michel (AAA) e a Highgate (AAA), ambas susceptíveis ao mal-do-Panamá. Esta susceptibilidade faz com que elas sejam rapidamente substituídas pelas cultivares do subgrupo Cavendish.

Apesar de serem consideradas muito sensíveis às mutações, principalmente quanto ao porte, as cultivares do subgrupo Cavendish são amplamente utilizadas comercialmente no mundo inteiro. Dentre as principais cultivares desse subgrupo podemos citar a Nanica, Nanicão, Willians Hybrid, e Grand Naine (Simmonds, 1954). Muito cultivada na Martinica, a cultivar Grande Naine (AAA) apresenta porte intermediário entre a Nanica e a Nanicão, alta produtividade sob condições ideais, podendo atingir até 50 – 60 t / ha / ciclo.

A Nanicão (AAA) é uma mutação da cultivar Nanica que ocorreu no Estado de São Paulo (Moreira & Saes, 1984). Apresenta porte que varia entre 3,00 – 3,50 m, pseudocaule e folhas com a mesma coloração da Nanica e roseta foliar mais descompacta. Outra cultivar AAA, de interesse comercial no Brasil, é a cultivar africana Caipira que apresenta alta resistência à sigatoka negra e produção de 25 – 30 t /ha / ciclo (Alves, 1999).

Os subgrupos Prata, Maçã e Terra são os mais importantes representantes do grupo de cultivares do grupo AAB. No subgrupo Prata estão inseridas diversas variações dentre as quais se destacam Prata Comum, Prata Anã e Pacovan (Alves, 1990).

A Prata Comum (AAB) é considerada uma das mais importantes bananas “nobres” cultivadas no país e de grande aceitação e valor no mercado interno. Pode-se destacar como desvantagem seu porte muito elevado que dificulta a execução de tratos culturais e colheita. A incidência do mal-do-

Panamá tem aumentado de maneira alarmante comprometendo a viabilidade da cultura no sul de Minas Gerais (Silva, 1998).

Tendo seus frutos muito semelhantes aos da Prata Comum, a Prata Anã (AAB) não apresenta dificuldade de comercialização. Devido a sua menor altura, maior produtividade e menor susceptibilidade ao mal-do-Panamá, os plantios comerciais de Prata Comum estão sendo substituídos pela cultivar Anã (Vicente, 1998).

A Prata do Nordeste ou Pacovan (AAB) é considerada uma mutação da Prata, entretanto, é mais robusta, pseudocaule mais grosso e mais alto, apresentando brotações mais vigorosas. Possui elevada tolerância ao mal-do-Panamá e elevada resistência a sigatoka e é pouco atacada pela broca da bananeira (Silva, 1998).

A mais nobre cultivar para os brasileiros é a Maçã (AAB) devido ao seu paladar delicado, polpa macia e perfumada. Popularmente é considerada uma “fruta medicinal” e adequada para se oferecer para pessoas enfermas. Trata-se de uma cultivar cuja exploração é de alto risco pela sua extrema suscetibilidade ao mal-do-Panamá. Desta forma os cuidados básicos para sua implantação se referem a áreas não contaminadas e mudas sadias, o que não é fácil de se conseguir considerando-se a propagação realizada ao nível de campo (Martinez, 1981).

Outra cultivar do grupo AAB é a Mysore. Embora apresente alta tolerância ao mal-do-Panamá, destacando-se também pela alta resistência ao mal de Sigatoka, mas não teve boa aceitação no mercado, pois foi comercializada como uma banana Prata de pequeno tamanho. Não se deve desvalorizar, entretanto, a sua utilização em áreas contaminadas pelo mal-do-Panamá, quando não se quer optar por outras cultivares resistentes ou tolerantes à doença (Cordeiro, 1991).

O grupo AAAB destaca-se por apresentar plantas muito vigorosas com características intermediárias entre as cultivares AAA e AAB e resistência ao mal de sigatoka. As mais importantes, Pioneira, FHIA - 01 (Prata Anã X SH-3142), FHIA - 18, SH - 3640 (Prata Anã X SH-3393) são originárias de cruzamentos artificiais entre triplóides e diplóides melhorados. Como exemplo, podemos citar a cultivar Pioneira, um híbrido tetraplóide de Prata Anã e Lidi, mais precoce e semelhante ao progenitor Prata Anã em relação ao vigor, porte e sabor dos frutos (Alves, 1999).

A cultivar Ouro da Mata (AAAB) é considerada um híbrido espontâneo da Prata que também apresenta resistência ao mal-do-Panamá e menor exigência em fertilidade do solo, comparada com a Prata (Silva, 1998).

O grupo ABB, representada pelas cultivares Terra, D'Angola, Prata Zulu e Figo do subgrupo Bluggoe, também conhecidas por "banana de fritar", devido ao alto teor de amido em seus frutos, não são relevantes economicamente, apesar da sua característica de resistência ao mal-do-Panamá e ao mal de sigatoka que podem ser úteis em programas de melhoramento.

Outra cultivar banana do subgrupo Bluggoe que também possui características adequadas para consumo frita é a Marmelo (AAB).

## 2.2 Produção e Certificação de mudas de bananeiras

Mesmo com a evolução das técnicas de produção de mudas de bananeiras, muitos plantios comerciais dessa frutífera são comprometidos pela utilização de mudas de má qualidade, muitas vezes são retiradas de bananais em produção ou ainda por causa do desconhecimento das normas para produção de mudas pelos viveiristas e compradores (Menegucci, 1993).

A multiplicação de bananeiras pode ser obtida por via assexuada ou vegetativa por meio do rizoma ou partes do mesmo (propagação "in vivo"), utilizando-se gemas laterais e brotações que a planta mãe emite no campo

(propagação convencional) ou através da micropropagação (propagação “in vitro”). Estas metodologias de via vegetativa, exceto a micropropagação, apesar de simples e de baixo custo, tem sido responsáveis pela disseminação e mesmo pela perpetuação de problemas fitossanitários (Godinho, 1994).

A micropropagação é a metodologia mais avançada em termos de propagação, apresentando com grande vantagem a produção de mudas uniformes, isentas de pragas e doenças. Além disso, esta técnica possibilita a obtenção de uma grande quantidade de mudas, de excelente qualidade, em um curto espaço de tempo (George, 1996).

A qualidade da muda é resultante de numerosos fatores. Os principais não podem ser avaliados apenas com um exame da muda no ato da compra. A confiança no viveirista e no esquema oficial de produção e de fiscalização garante a qualidade da muda, principalmente quanto à sua sanidade e à fidelidade do clone (Hoffmann, 1998).

No Brasil, mudas de frutíferas podem ser produzidas no sistema de fiscalização ou de certificação. No sistema de fiscalização, são produzidas as mudas fiscalizadas. Este é o sistema de uso mais comum no país. É um sistema que garante basicamente a qualidade morfológica, fisiológica e fitossanitária da muda.

Já o sistema de certificação é mais rígido que o anterior, pois além da qualidade intrínseca da muda, é necessário que a muda tenha um “certificado de origem vegetal”, atestando a origem genética do material propagativo utilizado. No entanto, não existe uma metodologia científica definida para a realização da certificação genética das mudas de bananeiras. Na prática, os produtores rurais acreditam na idoneidade dos laboratórios de produção de mudas de bananeiras (Lima, 1999).

Por ser uma evolução em relação à fiscalização, somente viveiristas que já produziram (ou produzem) mudas fiscalizadas podem ser autorizados a

produzirem mudas certificadas. Este sistema é ainda pouco difundido no Brasil, mas deve ser visto como um objetivo a ser alcançado (Ducroquet, 1996).

A produção e a comercialização de sementes e mudas de frutíferas no Brasil são regulamentadas pela Lei 6507 de 19 de Dezembro de 1977. A portaria do Ministério da Agricultura nº 386 de 15 de dezembro de 1980 regulamenta os padrões de qualidade para a produção, transporte e comercialização de mudas de bananeira em todo o território nacional (Anexo 1a). A partir desta portaria, cada Comissão Estadual de Sementes e Mudas estabelece os padrões a serem respeitados pelos produtores em cada Estado da Federação.

Em Minas Gerais, a partir de 1980, a Comissão Estadual de Sementes e Mudas - CESM organizou a Sub-comissão de Fruticultura com o objetivo de iniciar, no Estado, o Sistema de Produção de Mudas Fiscalizadas e Certificadas.

Os produtores de mudas de Minas Gerais, deverão atender aos padrões mínimos estabelecidos pelo Instituto Mineiro de Agropecuária através da portaria nº 095 de 7/01/94 (Anexo 1a).

### **2.3 Marcadores Moleculares RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) e Divergência Genética**

Marcador molecular pode ser definido como todo e qualquer fenótipo decorrente da expressão de um gene, como no caso de proteínas, caracteres morfológicos, ou de um segmento específico de DNA (correspondente a regiões expressas ou não do genoma), cuja seqüência e função podem ou não ser conhecidas (Ferreira & Grattapaglia, 1998). Estes são poderosas ferramentas que têm facilitado o estudo de diversas áreas da biologia, pura ou aplicada, cobrindo questões de identificação de cultivares, evolução e genética de populações, entre outras (Symondson & Liddell, 1999).

Os marcadores moleculares surgiram com o advento das técnicas de biologia molecular, sendo que, em um primeiro momento, a utilização de

enzimas de restrição permitiu a análise do polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição de DNA, conhecido como RFLP ( Restriction Fragment Length Polymorphism).

Em meados dos anos 80, o desenvolvimento do processo de amplificação em cadeia, utilizando uma DNA polimerase, levou à descrição de outras classes de marcadores moleculares; e hoje, um número virtualmente ilimitado de marcadores moleculares altamente polimórficos podem ser obtidos em qualquer organismo vivo, através de diversas técnicas (Ferreira & Grattapaglia, 1998).

Entre os vários tipos de marcadores moleculares disponíveis destacam-se como os de maior utilização o RFLP, RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), AFLP (Amplified Fragment Length Polimorphism) e os microssatélites ou SSRs (Simple Sequence Repeat).

× A técnica de DNA polimórfico amplificado ao acaso (RAPD) (Welsh & McClelland, 1990; Willians et al., 1990) é uma variação do protocolo de PCR (Polymerase Chain Reaction), que utiliza apenas um único primer com aproximadamente 10 nucleotídeos de comprimento de seqüência arbitrária, que se anela em regiões arbitrárias do genoma e sintetiza múltiplos produtos de amplificação, detectando polimorfismo na ausência de informação específica da seqüência de nucleotídeos do DNA molde (Willians et al., 1990).

O primeiro passo para a utilização desta técnica refere-se a seleção dos primers a serem utilizados, cuja escolha deve basear-se na seguinte ordem: revelar diferenças, produzir bandas bem definidas e favorecer um padrão reproduzível (Loxdale et al., 1996).

O RAPD é capaz de detectar a alteração de uma única base no DNA genômico, uma vez que a alteração em uma única base do primer gera produtos de amplificação totalmente diferentes, uma alteração de uma base do genoma pode levar a não amplificação de um fragmento. Mas isto não implica, no



entanto, que todas as amplificações são resultado do perfeito pareamento entre o primer e o DNA molde (Willians et al., 1990; Thormann et al., 1994).

Marcadores moleculares tipo RAPD comportam-se como dominantes, ou seja, não é possível distinguir se o segmento de DNA amplificado provém de um loco heterozigoto ou homozigoto (dominante) (Carlson et al., 1991; Willians et al., 1990).

A técnica de RAPD oferece diversas vantagens sobre outros métodos para o estudo da variabilidade genética. Um ilimitado número de marcadores RAPD pode ser gerado, ao contrário do que ocorre com marcadores isoenzimáticos que são limitados a poucas regiões do genoma, além do fato de que um vasto número de primers RAPD pode ser sintetizado para a análise de uma ampla variedade de espécies (Cenis et al., 1993; Willians et al., 1990); nenhum trabalho preliminar é requerido, como o isolamento de sondas clonadas de DNA, preparação de filtros para hibridação; marcadores RAPD é um método que permite automação e apresenta baixo custo (Willians et al., 1990).

Como desvantagens do método tem-se que, em estudos de filogenia não é possível distinguir a origem genômica (nuclear ou citoplasmática) dos fragmentos. A homologia das seqüências das bandas com mesma mobilidade no gel não é conhecida (Thormann et al., 1994; Tingey & Tufo, 1993) não sendo possível identificar se bandas com mesmo peso molecular de dois indivíduos representariam um caráter homólogo (herdado de um ancestral comum) ou homoplástico (caráter que se desenvolveu independentemente dentro da população) (Pornkuwat et al., 1998). Não é possível distinguir alelos heterozigotos dos homozigotos (Carlson et al., 1991; Willians et al., 1990) e a reprodutibilidade do método pode ser influenciada pela enzima *Taq* DNA polimerase utilizada, quantidade de  $MgCl_2$ , qualidade do DNA, o tipo de termociclador e método de extração de DNA (Cenis et al., 1993; Loxdale e Lushai, 1998; Loxdale et al., 1996; Suazo et al., 1998).

Ferreira & Grattapaglia (1998) enumeram a aplicação dos marcadores RAPD na obtenção de “fingerprints” genômicos de indivíduos, cultivares e populações; na análise da estrutura e divergência genética em populações naturais, populações de melhoramento e bancos de germoplasma; para o estabelecimento de relacionamentos filogenéticos entre diferentes espécies; para a construção de mapas genéticos de alta cobertura genômica; e para a localização de genes de interesse econômico.

A gama de genomas estudados com a utilização da técnica de RAPD é a mais variada possível, podendo abranger desde microorganismos como a *E. coli* (Tseng et al., 2001), fungos fitopatogênicos (Maki, 1999), ou até os organismos mais complexos como o feijão (Duarte, 1998) e a cigarrinha do milho (*Dalbulus maidis*) (Oliveira, 2000). ✕

Em Bananeiras, diversos tipos de marcadores moleculares já foram utilizados para os mais diversos fins. Visando estudar a divergência genética entre as cultivares de bananeiras, técnicas moleculares como o RAPD (Pillary et al., 2001; Paz, 2000; Crouch et al., 1999a ; Bhat & Jarret, 1995), Inter - Alu (Baurens, 1998), RFLP (Bhat et al., 1994), isoenzimas (Lebot, 1993); AFLP (James et al., 98), Oligo - probes (D’Hont et al., 2000; Bhat et al., 1995) e microssatélites (Crouch et al., 1999a; Crouch et al., 1999b Tenkouano et al., 1999; Grapin et al., 1998; Crouch et al., 1998; Tenkouano et al., 1998; Kaemmer et al., 1997; Baurens et al., 1996) já foram utilizados com sucesso. Apesar de vários trabalhos nesta área, a maioria das cultivares de bananeiras comerciais utilizadas no Brasil ainda não foram estudadas.

Crouch et al. (1999a) conduziram um experimento no qual foram comparadas as técnicas de microssatélites, AFLP e RAPD para a análise genotípica de 28 indivíduos triploides do gênero *Musa* obtidos a partir de cruzamentos artificiais. Discordando do proposto por Powell et al. (1996), evidenciou-se a superioridade dos marcadores AFLP sobre os microssatélites.

No entanto, observou-se que a técnica de RAPD também foi muito eficiente na identificação das cultivares. Segundo Crouch (1999a), a utilização dos marcadores RAPD para estudos de divergência genética no gênero *Musa* é perfeitamente cabível. Reafirmando esta colocação, Bhat et al. (1994) em seu estudo comparativo entre RFLP e RAPD, não encontraram diferenças significativas entre os dois métodos para estabelecer a divergência genética em germoplasma indianos de bananeiras.

Para o estudo da divergência genética é necessário o estabelecimento de uma medida (coeficiente) de similaridade / dissimilaridade entre dois indivíduos, sendo que este é o ponto de partida para várias técnicas de análise multivariada, que permite melhor visualização dos relacionamentos entre os mesmos (Krazanowsy, 1998).

Segundo Wier (1990), os métodos de agrupamento utilizam a dissimilaridade ou distância entre indivíduos ou populações para a formação dos grupos. São várias as medidas de dissimilaridade existente. A mais usual das distâncias é a Euclidiana, definida em termos dos vetores de pontos  $X_i$  e  $X_j$ . A distância é então calculada para cada  $n(n-1) / 2$  pares de vetores, gerando uma matriz simétrica  $n \times n$ , com zeros na diagonal principal, ou seja, a distância entre dois pontos no espaço euclidiano é igual à raiz quadrada da soma de quadrados das diferenças em projeções nos eixos ortogonais. É calculada pela equação:

$$DG_{x,y} = \{ \sum_i (x_i - y_i)^2 \}^{1/2}.$$

Outros coeficientes de dissimilaridade são a Jaccard, Nei e Li, Concordância Simples, Power distance e Percent Disagreement (Porcentagem de Discordância). Sendo que, esta última distância leva em consideração apenas as diferenças entre os indivíduos estudados (Wier, 1990). A Porcentagem de Discordância é calculada pela equação:

$$DG_{x,y} = (n^0 x_i \neq y_i) / i.$$

Esses coeficientes, em sua maioria, são calculados a partir de variáveis binárias representando presença e ausência, com valores de 1 e 0, respectivamente. Marcadores tipo RAPD são incluídos nesse tipo de variável. Portanto, a comparação de dois itens quaisquer com esta técnica, possibilita a construção de uma tabela 2X2 com formato de contingência, utilizando-se das frequências de bandas observadas no zimograma. A análise deve limitar-se às bandas nítidas, que apresentam constância e nitidez nos géis. No esquema de contingência abaixo, quatro combinações dos tipos concordância e discordância são possíveis:

		População P		Total
		Presença (1)	Ausência (0)	
População Q	Presença (1)	a	B	a + b
	Ausência (0)	c	D	c + d
Total		a + c	b + d	n

$$n = a + b + c + d.$$

Com as letras a, b, c, d assumindo as seguintes representações:

a = presença das bandas em ambas as populações;

b = presença da banda na população Q e ausência em P;

c = ausência da banda em Q e presença em P,

d = ausência da banda em ambas as populações.

A escolha do coeficiente apropriado está diretamente relacionado com as suas propriedades como a metricidade e a configuração euclidiana são especialmente relevantes. O atendimento a inequação triangular, por exemplo, permite a elaboração de dendrogramas (Gower & Legendre, 1986).

Aspectos outros como a natureza dos dados e o tipo de análise a ser implementada são igualmente fundamentais para nortear a escolha do coeficiente. Assim, alguns dados quantitativos, podem ser melhor investigados quando convertidos em dados binários, de modo a reunir todos os valores abaixo e acima de um nível de interesse. Também, o método de análise pode limitar a escolha do coeficiente (Alfenas, 1998).

Quando se trata de métodos de agrupamento, a literatura, da mesma forma que nos tipos de coeficientes, também revela uma enorme diversidade de métodos.

O princípio geral de todos os métodos de agrupamento tem sido o de maximizar a similaridade dentro de grupos e a dissimilaridade entre grupos. Em geral, podemos dividi-los em: Métodos Hierárquicos Aglomerativos, Métodos de Partição e Métodos de Otimização.

Os Métodos Hierárquicos Aglomerativos se processam por séries sucessivas de fusões. Os  $n$  itens são classificados em  $n-1$ ,  $n-2$ , grupos que, por sua vez, são gradualmente fundidos até unir todos os itens em um único grupo. As fusões são baseadas em subdivisões hierárquicas operadas sobre a matriz de distância, permitindo a geração de uma árvore de classificação bidimensional, denominada dendrograma. Em todos esses métodos, a distância entre itens é o critério aplicado para definir grupos (Dias, 1998).

Método do Vizinho Mais Próximo, Método do Vizinho Mais Distante e Método das Médias das Distâncias são os três Métodos Hierárquicos Aglomerativos mais utilizados (Cruz & Regazzi, 1994).

Também conhecido como método da ligação simples ou single linkage o Método do Vizinho Mais Próximo se inicia pela identificação dos dois itens com menor distância relativa entre si, processada na matriz de distância  $n \times n$ . Esse par de itens é fundido e gera o primeiro grupo. A seguir são calculadas as distâncias dos  $n - 2$  itens restantes com relação a cada um dos dois itens do

primeiro grupo, sendo identificada a menor dessas distâncias para a matriz de distância reduzida  $(n - 1) \times (n - 1)$ . A redução da dimensão da matriz ocorre em virtude de o primeiro grupo formado ser inserido nela como um único item. Nessa seqüência, o item identificado como o mais próximo do primeiro grupo é fundido a ele para formar um grupo de três itens. O processo se repete até a formação de um único agrupamento.

O método do vizinho mais distante é a antítese do vizinho mais próximo, pois opera com o par mais distante de itens.

No método das médias das distâncias, o critério utilizado para a formação dos grupos é a média das distâncias entre os pares de itens que formam cada grupo, como a própria denominação informa. Em inglês é conhecido como Unweighted Pair-Group Mean Average (UPGMA) (Mumm & Dudley, 1994). Entretanto, a seqüência de operações é semelhante àquela aplicada anteriormente (Dias, 1998).

O comum a todos os três métodos de agrupamento descritos é que eles operam sobre a matriz de distância, dispensando o retorno à matriz de dados originais (Dias, 1998).

A disponibilidade de softwares para processamento de análises multidimensionais é enorme.

Outra análise que, atualmente vem sendo realizada é a verificação da informatividade do loco e do primer na análise de divergência genética (Polymorphic Index Content – PIC). A informatividade do loco  $p_i$  é a frequência do alelo  $p$  no loco  $p_i$ , calculado pela equação:  $I = 1 - \sum_i p_i^2$ , e a informatividade do primer  $p_{ij}$  é a frequência do alelo  $p$  do loco  $i$ , no primer  $j$ , sendo calculada pela equação:  $I = 1 - \sum_i \cdot \sum_j p_{ij}^2$ .

Análises tipo “Bootstrap” também vem sendo realizadas atualmente e tem por objetivo verificar qual o número mínimo de bandas polimórficas necessárias para que a formação dos grupos seja confiável. Nesta metodologia,

são realizadas inúmeras reamostragens, utilizando sempre um número crescente de bandas para obter valores de correlação entre as reamostragens. O método não é limitado pelo número de unidades reamostradas e pode fornecer várias novas estimativas para uma melhor aproximação da distribuição dos grupos no dendrograma. Ao invés de formar novas reamostragens através da omissão de uma banda por vez, o Bootstrap realiza sorteios ao acaso das bandas realizando novas análises até atingir o número máximo de bandas utilizados para a análise de divergência genética. A cada análise são gerados novos valores de correlação e conseqüentemente, novas somas de quadrados dos desvios. O número mínimo de bandas para a formação de agrupamentos é considerado confiável quando os valores de correlação e das somas dos quadrados dos desvios não sofrem variações significativas. O valor máximo de correlação é igual a 1, sendo encontrado quando a análise bootstrap utiliza o número máximo de bandas polimórficas que originou o agrupamento original. Da mesma forma, o valor máximo encontrado para a soma dos quadrados dos desvios é igual a zero (Wier, 1990).

#### **2.4 Vírus do Mosaico das Cucurbitáceas (CMV)**

O mosaico da bananeira é uma doença causada por um vírus denominado “Vírus do Mosaico das Cucurbitáceas” (Cucumber Mosaic Virus – CMV), o qual ocorre em lavouras de bananeiras (*Musa cvs.*), em vários países e em praticamente todos os estados do Brasil.

O plantio de mudas de bananeiras doentes é a principal forma de disseminação do vírus de uma área para outra e mesmo dentro da lavoura. Não existem produtos químicos para controlar o vírus nas plantas doentes. As medidas de controle devem ser tomadas de forma integrada, visando impedir a entrada do vírus na lavoura. É essencial a utilização de mudas, de preferência com certificado fitossanitário, e quando ocorrem na lavoura touceiras com

sintomas, a única saída para o produtor é a eliminação das mesmas (Stover e Simmonds, 1987).

O CMV, membro típico do gênero *Cucumovirus* (família Bromoviridae), tem distribuição mundial e é comumente encontrado em frutíferas, plantas ornamentais e em hortaliças (Tomlinson, 1987). Entre os fitovírus, o CMV é o que apresenta a maior gama de hospedeiros. Palukaitis et al. (1992) afirmam que são mais de 1000 espécies de hospedeiros. Sua transmissão é feita, com facilidade, via extrato tamponado, enxertia e também por mais de 60 espécies de afídeos, de modo não circulativo (Peden & Symonds, 1973).

As partículas dos cucumovírus são icosaédricas, com cerca de 30 nm de diâmetro (Figura 1).

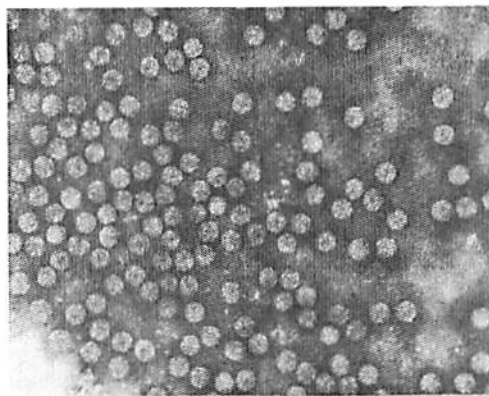


FIGURA 1. Partículas virais de CMV. EMBRAPA Milho e Sorgo, Sete Lagoas - MG, 2002.

O capsídeo é composto de 180 subunidades de um polipeptídeo com peso molecular de 24 KDa, e o genoma é composto de três RNAs de fita simples, sentido positivo (ssRNA), denominados RNA 1, RNA 2 e RNA 3



(Peden & Symonds, 1973). O RNA 1 (3357 – 3389 nts.) (Hyakawa et al., 1989) e o RNA 2 (3035 – 3050 nts.) (Rizzo et al, 1988) estão envolvidos na replicação do genoma viral, codificando as proteínas 1 a e 2 a, respectivamente, que compõem a replicase. O RNA 3 (2197 – 2217nts.) codifica a proteína 3 a, que está envolvida no movimento intercelular do CMV (Davies & Symonds, 1988), e a proteína capsidial (Habibi & Francki, 1974), que é expressa mediante um RNA subgenômico, designado RNA 4. A proteína capsidial (cp) está envolvida no movimento do vírus célula a célula e a longa distância e no encapsulamento da partícula viral (Taliński & Garcia-Arenal, 1995). O gene da capa protéica foi sequenciado por Hsu et al. (1993). Outros 81 acessos da seqüência genômica do CMV já estão disponíveis no EMBL / GenBank. Recentemente, um segundo gene no RNA 2, denominado 4 b, expresso a partir de um RNA subgenômico (RNA 4 a), foi descoberto nos cucumovírus, o que os diferencia dos outros gêneros da família Bromoviridae (Ding et al., 1997). Segundo Ding (1997), o produto do gene 2 b está envolvido no movimento a longa distância e é um fator de virulência. Além desses RNAs, partículas virais de alguns isolados de CMV podem conter uma quinta molécula de RNA, denominada RNA satélite (satRNA) (Mossop & Francki, 1978).

Apesar do seu pequeno tamanho, isolados de satRNA podem alterar drasticamente a replicação e expressão dos sintomas causados pelo CMV, induzindo desde atenuação até acentuação dos sintomas. Neste último caso, é comum a indução de sintomas necróticos. A maioria dos isolados de satRNA já estudada atenua os sintomas nas plantas infectadas pelo CMV (Jacquemond e Leroux, 1982; Garcia-Arenal et al., 1987).

Os sintomas causados pelo CMV em bananeiras são encontrados nas folhas, onde geralmente se observam listras verdes-claras entremeadas com listras verdes escuras (mosaico), além de ondulações nas bordas e redução no limbo foliar. Pecíolos e folhas jovens também apresentam esses sintomas. As

plantas infectadas geralmente apresentam uma redução no crescimento, e, conseqüentemente, ocorre a produção de cachos com frutos pequenos e sem valor comercial (Alves, 1999).

As estirpes do CMV apresentam diferenças em patogenicidade e gama de hospedeiros (Kaper & Waterworth, 1981). As estirpes podem ser divididas em dois subgrupos, I e II, sendo que os membros do subgrupo I comumente induzem sintomas mais severos e ocorrem predominantemente nos trópicos e subtropicais, enquanto os isolados do subgrupo II prevalecem nas regiões temperadas (Haase et al., 1989).

A caracterização das estirpes de CMV em sorogrupos ou subgrupos é normalmente feita por métodos sorológicos, que são demorados e podem proporcionar resultados poucos conclusivos (Zambolim, 1997).

## **2.5 Métodos de Detecção de Vírus**

A utilização de mudas comprovadamente isentas de fitopatógenos é o primeiro passo para se alcançar o sucesso na bananicultura. Diversas são as técnicas de detecção empregadas para a indexação de mudas de bananeiras.

Em 1969, Avrameas propôs pela primeira vez a utilização de imunoglobulina conjugada a uma enzima para detecção de antígenos e anticorpos. No entanto, o uso conjugado com a finalidade de detectar e quantificar a imunoglobulina G foi descrita por Engvall & Perlmann (1971), que denominaram este método de ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assays).

Voller et al.(1976) e Clark & Adams (1977), foram os primeiros a utilizar o método ELISA para a diagnose e quantificação de vírus em plantas. Desde então, o método ELISA vem sendo utilizado para detecção e quantificação de um grande número de antígenos de plantas, incluindo o CMV em bananeiras micropropagadas (Pérez et al., 1995).

O método ELISA baseia-se no princípio clássico da sorologia, onde o antígeno é reconhecido pelo antissoro (imunoglobulina) que lhe deu origem, formando o complexo anticorpo-antígeno, associado a propriedades colorimétricas. A coloração ocorre devido à ação de determinada enzima (previamente conjugada à imunoglobulina) sobre um substrato cromogênico. Isto é o que difere o teste ELISA dos demais testes sorológicos mais tradicionais empregados em virologia que utilizavam-se de reações de precipitação para obter seus resultados (Clark & Adams, 1977).

Estes autores afirmam que para muitas fitoviroses as técnicas sorológicas convencionais não podem ser utilizadas em razão de limitações, como baixa concentração de vírus nas amostras e presença no extrato vegetal de inativadores ou inibidores virais.

Muitas plantas, principalmente as de natureza lenhosa, como *Prunus*, contêm compostos que podem dar origem a reações não específicas indesejáveis que mascaram as reações devidas ao vírus, ou podem ainda inibir reações imunológicas ou enzimáticas nos testes ELISA (Clark & Adams, 1977). A intensidade das reações não específicas no teste ELISA, devidas a compostos existentes em extratos de certas plantas, segundo esses autores, pode ser reduzida ou eliminada, pelo uso de aditivos ao tampão de extração ou pela diluição do extrato foliar.

Dependendo da natureza e da idade do material vegetal utilizado em ELISA, podem surgir interferências nas reações, resultando em reações inespecíficas, o que impede a comprovação da presença do vírus (Fajardo, 1994).

Variações do teste ELISA tem sido desenvolvidas, mas o DAS-ELISA (double-antibody sandwich) tem sido o mais utilizado na detecção de viroses em plantas. A técnica de ELISA-Indireta envolve a cobertura da placa com a suspensão do vírus, seguida da adição do anticorpo específico e do anticorpo

produzido em uma espécie de animal diferente, o qual é conjugado a uma enzima específica. Assim como no DAS-ELISA e no ELISA-Direto, o último passo é a adição de substrato adequado para que se possa visualizar a reação colorimétrica da enzima conjugada (Van Regenmortel, 1982).

Kiranmai et al. (1998) comparando ELISA-Indireto, ELISA-Direto e DAS-ELISA não observou diferenças entre a sensibilidade dos três testes para a detecção do CMV em amostras de folhas de bananeiras.

A técnica ELISA pode ser aplicada para vírus de diferentes tipos morfológicos, tanto em preparados purificados, quanto em extratos brutos. O método é particularmente conveniente quando existe um grande número de amostras a serem testadas em um curto espaço de tempo. Ele é bastante sensível detectando concentrações tão baixas quanto 1 a 10  $\mu\text{g} / \text{mL}$ , e tem sido bastante explorado para a diagnose de vírus em plantas (Truta, 1997).

O teste ELISA é o recomendado pelo Instituto Mineiro de Agropecuária para a realização da certificação fitossanitária de mudas de bananeiras produzidas em Minas Gerais. A utilização dessa metodologia vem sendo utilizada por diversos pesquisadores para detectar a presença do CMV em suas regiões. Castaño et al. (1994), detectou através de DAS-ELISA e de microscopia eletrônica a presença do CMV em plantações de Bananeiras no Valle Del Cauca, Colômbia. A partir deste relato é que começaram as primeiras discussões sobre o controle deste vírus em plantios de bananeiras na Colômbia. Wu et al. (1997) diferenciou através do teste ELISA Indireto duas estirpes do CMV em bananais de Taiwan.

No Brasil, utilizando a técnica DAS-ELISA, estados como Ceará (Lima et al., 1988), Rio de Janeiro (Brioso et al., 1987), Pará (Trindade et al., 1998) São Paulo (Colariccio et al., 1996) entre outros, conseguiram detectar em bananais a presença do CMV.

Atualmente, com o advento das modernas técnicas moleculares deslumbrou-se uma nova e quase inesgotável fonte de alternativas mais precisas e sensíveis para a detecção de fitopatógenos em vegetais.

A reação em cadeia da polimerase (polymerase chain reaction – PCR) é um método *in vitro* para a síntese enzimática de um fragmento de DNA específico usando dois oligonucleotídeos (“primers”) que hibridizam nas fitas opostas de um fragmento de DNA molde, flanqueando a região de interesse (Saiki et al., 1989).

Os vírus de plantas podem ter o seu genoma constituído de ssRNA, dsRNA, ssDNA ou dsDNA, sendo que a maioria dos vírus de plantas apresenta genoma constituído de ssRNA, inclusive o CMV (Murphy et al., 1995). Com isso, para a amplificação por PCR dos vírus com genoma constituído de RNA, faz-se necessária a síntese de uma fita de DNA complementar (cDNA) ao RNA genômico do vírus. Este cDNA é sintetizado através da utilização de uma transcriptase reversa (RT-PCR), enzima que, utilizando uma fita de RNA como molde, sintetiza uma fita de DNA complementar, desde que haja um oligonucleotídeo de DNA homólogo a uma seqüência do RNA viral alvo. As transcriptases reversas de “Avian myeloblastosis virus” (AMV) e “Moloney murine leukemia virus” (MMLV) são as mais utilizadas. A AMV é mais adequada para a síntese de cDNAs mais longos devido à sua baixa reatividade de RNase H (Sambrook et al., 1989).

A técnica de PCR tem sido utilizada para a detecção de diversos fitopatógenos como fungos (Haber et al., 1995), bactérias (Audy et al., 1996), fitoplasmas (Barros et al., 1998) e vírus (Fenby et al., 1995).

Para a detecção de vírus em plantas a técnica vem sendo amplamente utilizada o que mostra o grande potencial da utilização da PCR para diagnose de viroses importantes. Além da importância da detecção e diagnóstico de patógenos em plantas, a PCR tem sido empregada em estudos de filogenia,

clonagem, sequenciamento, preparação de sondas moleculares e estudos de evolução (Eiras et al., 1998).

Em bananeiras, esta técnica vem sendo utilizada para identificar qual é o subgrupo do CMV que esta causando a infecção de bananeiras em determinadas regiões. Singh et al. (1995), utilizando RT-PCR identificou a presença do Subgrupo I do CMV em plantações de bananeiras no sul da Austrália.

Já Gould et al. (1978), utilizando RT-PCR caracterizou o satRNA associado ao RNA do CMV.

Outra utilização para esta técnica é a detecção do vírus em matrizes utilizadas para a micropropagação de bananeiras. Hsu et al. (1995) obteve a detecção do CMV em amostras de bananeiras de até 100 fg /  $\mu$ L. Comparado com os resultados obtidos por este mesmo autor, o RT-PCR apresentou uma sensibilidade 1.000 vezes maior que o teste de hibridação molecular e 100.000 vezes superior ao ELISA.

Outro teste molecular de detecção de vírus em plantas é o de hibridação molecular. A técnica de hibridação de ácidos nucléicos está baseada na capacidade destes para se desnaturar e voltar a unir-se em fitas complementares quando submetidos a determinadas condições. Para o seu uso no diagnóstico de fitopatógenos, se forma uma fita híbrida complementar entre o ácido nucléico da amostra a ser testada, geralmente imobilizada em uma matriz sólida (membrana de nylon ou nitrocelulose), e o material usado como sonda. Caso haja complementariedade com o ácido nucléico da amostra, um duplex será formado e este poderá ser visualizado pela marcação da sonda por diferentes métodos e revelação com substrato específico (Conci, 1999).

Sondas marcadas radioativamente tem sido comumente empregadas para hibridação de ácidos nucléicos, sendo mais utilizado como marcadores o  $^{32}$ P e o  $^{35}$ S. No entanto, discussões sobre o impacto ambiental, segurança durante seu uso e posterior descarte, menor durabilidade, dificuldade para a compra, e o

custo do uso de marcadores radioativos, tem exigido o desenvolvimento de métodos alternativos que empregam marcadores não radioativos (Dietzgen et al., 1994). Marcadores como biotina e a digoxigenina estão disponíveis como alternativas aos marcadores radioativos.

A biotina forma complexos com um grupo aryl-azida fotoreativo, produzindo acetato de fotobiotina. Quando uma mistura de ácido nucléico e acetato de biotina se expõe durante 10 a 15 minutos a altas intensidades de luz dentro do espectro visível, o grupo aryl-azida se converte em um grupo azylnitrene, que é extremamente reativo e favorece a união às cadeias de fita simples do ácido nucléico ou de fita dupla da molécula de biotina, de maneira covalente a cada 100-150 bases. Esta reação se prolonga, e a presença de biotina é detectada mediante o uso de estreptoavidina, que estará associada com uma enzima que, na presença de um substrato específico, reagirá provocando alteração de cor (Conci, 1999).

A digoxigenina é uma molécula esteroide isolada de *Digitalis purpurea*. Neste sistema de marcação, o nucleotídeo modificado DIG-dUTP's (digoxigenina unida ao dUTP), pode ser incorporado com alta eficiência (um grupo de DIG-dUTP's a cada 20 – 25 bases) a sondas moleculares usando “nick translation”, DNA random primer ou PCR. Ocorrendo hibridação entre a sonda marcada e o material testado, a digoxigenina pode ser detectada por fluorescência, quimioluminescência ou colorimetria. Neste último, a digoxigenina é detectada por um anticorpo (anti-Dig) conjugado a uma enzima como, por exemplo, a fosfatase alcalina, que na presença de azul de nitrotetrazolium (NBT) e 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato (BCIP) produz uma reação de cor (Conci, 1999).

Embora os métodos sorológicos sejam freqüentemente utilizados na detecção rotineira de vírus de plantas, a hibridação de ácidos nucléicos permite testes mais sensíveis e específicos (Harper & Creamer, 1995). Este método além

de permitir uma análise rápida de um grande número de amostras individuais de plantas para RNA's virais (Palukaitis, 1988). Por esse motivo, o uso de sondas moleculares, radioativas ou não, para detecção e estudo de vírus de planta tem sido cada vez maior. Saldarelli et al. (1994a e 1996) utilizou sondas moleculares para a detecção do CMV em parreiras e tomateiros.

Kiranmai et al. (1998) compararam a eficiência de sondas marcadas radioativamente com sondas marcadas com digoxigenina obtiveram uma sensibilidade de 40 pg /  $\mu$ L e 150 pg /  $\mu$ L para a detecção do CMV em amostras de folhas de bananeiras, respectivamente.

### 3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALFENAS, A. C. **Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins; fundamentos e aplicações em plantas e microorganismos.** 1998. 574p. Dissertação (Mestrado em Genética) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

ALVES, E. J. **A cultura da banana: aspectos técnicos, socioeconômicos e agroindustriais.** 2. ed. Brasília: EMBRAPA – SPI / Cruz das Almas: EMBRAPA – CNPMF, 1999. 585p.

ALVES, E. J. **Caracterização e avaliação de germoplasma de banana (*Musa spp*).** In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 7., 1984, Florianópolis. Anais... Florianópolis, SC: SBF / EMPASC, 1984. v. 1, p. 203 – 212.

ALVES, E. J. **Principais cultivares de banana no Brasil.** *Revista Brasileira de Fruticultura*, Cruz das Almas, v. 12, n.3, p 45 – 61, 1990.

AUDY, P.; BRAAT, C. E.; SAINDON, G.; HUANG, H. C.; LAROCHE, A. **A rapid and sensitive PCR-based assay for concurrent detection of bacteria causing common and halo blights in bean seed.** *Phytopathology*, St. Paul, v. 86, n. 4, p. 361-366, Apr. 1996.



AVRAMEAS, S. Coupling of enzymes to proteins with glutaraldehyde. Use of the conjugates for the detection of antigens and antibodies. *Immunochemistry*, Oxford, v. 6, n. 1, p. 43-52, 1969.

BANTTARI, E. E.; GOODWIN, P. H. Detection of potato virus S, X and Y by enzyme-linked immunosorbent assay on nitrocellulose membranes (Dot-ELISA). *Plant Disease*, St. Paul, v. 69, n. 3, p. 202-216, Mar. 1985.

BARROS, T. S. L.; KITAJIMA, E. W.; RESENDE, R. O. Diversidade de isolados brasileiros de fitoplasma através da análise do 16S rDNA. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v. 23, n. 4, p. 459-465, dez. 1998.

BAURENS, F. C.; NOYER, J. L.; LANAUD, C.; LAGODA, J. L. Inter - Alu PCR like genomic profiling in banana. *Euphytica*, Wellington, v. 99, n. 2, p. 137-142, 1998.

BAURENS, F. C.; NOYER, J. L.; LANAUD, C.; LAGODA, J. L. Use of competitive PCR to assay copy number of repetitive elements in banana. *Molecular Genetic*, New York, v. 253, n.1/2, p. 57-64, Nov. 1996.

BHAT, K. A.; JARRET, R. L. Random amplified polymorphic DNA and genetic diversity In Indian Musa germoplasm. *Genetic Resources and Crop Evolution*, Dordrecht, v. 42, n. 2, p. 107-118, June 1995.

BHAT, K. A.; BHAT, S. R.; CHANDEL, K. P. S.; LAKHANPAUL, S.; ALI, S. DNA fingerprinting of Musa cultivars with oligodeoxyribonucleotide probes specific for simple repeat motifs. *Genetic Analysis: Biomolecular Engineering*, Amsterdam, v. 12, n. 1, p. 45-51, Mar. 1995.

BHAT, K. A.; JARRET, R. L.; LIU, Z. W. RFLP characterization of Indian Musa germoplasm for clonal identification and classification. *Euphytica*, Wellington, v. 80, n. 1/2, p. 95-103, 1994.

BRIOSO, P. S. T.; HERRERO, C. R.; VILALOBOS, W. M. Identificação do vírus do mosaico do pepino em representantes da família Musaceae. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v. 12, n. 2, p.147, jun. 1987.

CARLSON, J. D.; WHALON, M. E.; GLAUBITZ, J. C.; LUK, V. W. K.; KAUFFELDT, C.; RUTLEDGE, R. Segregation of random amplified DNA markers in F1 progeny of conifers. *Theoretical and Applied Genetics*, Berlin, v. 83, n. 2, p. 194-200, 1991.

CASTAÑO, M.; GALVEZ, G. E.; ARROYAVE, J. A.; MORALES, F. J. Aislamiento de una cepa colombiana del virus del mosaico del banano. *Revista de la Asociacion Colombiana de Fitopatologia y Ciencias Afines*, Bogotá, v. 18, n. 2, p.130-134, 1994.

CENIS, J. L.; PEREZ, P.; FERERES, A. Identification of aphid (Homóptera: Aphididae) species and clones by random amplified polymorphic DNA. *Annals of the Entomological Society of America*, Lanham, v. 85, n. 5, p. 545-550, Sept. 1993.

CHEESMAN, E. E. Classification of the bananas. II. The genus *Musa*. *Kew Bulletin*, London, n. 2, p. 106-117, 1948.

CHEESMAN, E. E. Genetic and cytological studies of *Musa*. I. Certain hybrids of the Gros Michel banana. *Journal of Genetics*, Cambridge, v. 26, n. 3, p. 291-312, 1932a.

CHEESMAN, E. E. Genetic and cytological studies of *Musa*. II. Certain hybrids of the Gros Michel banana. *Journal of Genetics*, Cambridge, v. 26, n. 3, p. 313-316, 1932b.

CLARK, M. F.; ADAMS, A. N. Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for detection of plant viruses. *Journal of General Virology*, Reading, v. 34, n. 3, p. 475-483, Mar. 1977.

COLARICCIO, A.; EIRAS, M.; VICENTE, M.; HARAKAVA, R. Caracterização parcial de um isolado do vírus do mosaico do pepino de *Musa sp.* Nanicão. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v. 21, n. 2, p.268-274, jun. 1996.

CONCI, L. R. Sondas de hibridacion molecular. In: DOCAMPO, D. M.; LENARDÓN, S. L. *Métodos para detectar patógenos sistêmicos*. Córdoba, Argentina: INTA-JICA, 1999.

CORDEIRO, Z. J. M.; SHEPHERD, K.; SOARES FILHO, W. dos S.; DANTAS, J. L. L. Reação de cultivares e clones de banana ao mal-do-Panamá. *Revista Brasileira de Fruticultura*, Cruz das Almas, v. 13, n. 4, p. 197-203, 1991.

CROUCH, J. H.; CROUCH, H. K.; TENKOUANO, A.; ORTIZ, R. Comparasion of PCR - based molecular marked analyses of *Musa* breeding populations. *Molecular Breeding*, Dordrecht, v. 5, n. 3, p. 233-244, 1999b.

CROUCH, J. H.; CROUCH, H. K.; TENKOUANO, A.; ORTIZ, R. Segregation at microsatellite loci in Haploid and Diploid Gametes of *Musa*. **Crop Science**, Madison, v. 38, n. 1, p. 211-217, Jan./Feb. 1998.

CROUCH, J. H.; CROUCH, H. K.; TENKOUANO, A.; ORTIZ, R. VNTR – based diversity analysis of 2X and 4X full – sib *Musa* hybrids. **Electronic Journal of Biotechnology**, Dublin, v. 2, n. 3, 1999a. p. 32-40.

CRUZ, C. D.; REGAZZI, A. Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético. Viçosa: UFV, 1994. 390p.

D'HONT, A.; GOY, A. P.; ESCOUTE, J.; CARREEL, F. The interspecific genome structure of cultivated banana, *Musa* spp. Revealed by genomic DNA *in situ* hybridization. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 100, n. 2, p. 177-183, 2000.

DAVIES, C.; SYMONS, R. H. Further implications for the evolutionary relationships between tripartite plant viruses based on cucumber mosaic isolates from California. **Virology**, San diego, v. 165, n. 1, p. 216-244, July 1988.

DIAS, L. A. S.; KAGEYAMA, P. Y. Multivariate genetic distance and hybrid performance of cação (*Thebroma cacao*). **Brazil journal of Genetic**, Ribeirão Preto, v. 20, p. 63-70, mar. 1998.

DIETZGEN, R. G.; XU, Z.; TEYCHENEY, P. Y. Digoxigenin-labeled cRNA probes for the detection of two potyviruses infecting peanut (*Arachis hypogaea*). **Plant Disease**, St. Paul, v. 78, n. 7, p. 708-711, July 1994.

DING, S. W. Molecular basis of the long distance virus movement function encoded by the 2b gene of cucumber mosaic virus. In: INTERNATIONAL CONGRESS OF PLANT MOLECULAR BIOLOGY, 5., 1997, Singapore. Abstracts... Singapore: The National University of Singapore, and The Institute of Molecular Agrobiolgy, 1997. p.233.

DODDS, K. S. Genetic and cytological studies of *Musa*. V. Certain edible diploids. . **Journal of Genetics**, Cambridge, v. 45, p. 113-138, 1943.

DUARTE, J. M. Estudo da divergência genética em raças de feijão por meio de marcadores RAPD. 1998. 78p. Dissertação (Mestrado em Genética) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

DUCROQUET, J. P. H. J. Qualidade sanitária das mudas de fruteiras. *Informativo SBF*, Itajaí, v. 15, n. 1, p. 10-12, mar. 1996.

EIRAS, M.; RESENDE, R. O.; ÁVILA, A. C. Detecção de vírus de plantas através da reação em cadeia da polimerase. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v. 23, n. 1, p. 5-17, mar. 1998.

ENGVALL, E.; PERLMANN, P. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry*, Oxford, v. 8, n. 9, p. 871-874, 1971.

FARJADO, T. V. M. Imunodiagnóstico do mosaico da pimenta do reino causado pelo vírus do mosaico do pepino (CMV). Viçosa:UFV,1994. 63p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

FENBY, N. S.; SCOTT, N. W.; SLATER, A.; ELLIOTT, M. C. PCR and non-isotopic labeling techniques for plant virus detection. *Cellular and Molecular Biology*, Noisy-le-Grand, v. 41, n. 5, p. 639-652, July 1995.

FERREIRA, M. E.; GRATAPAGLIA, D. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análises genéticas. Brasília: EMBRAPA – CERNAGEN, 1998. p.220. EMBRAPA – CERNAGEN. Documento, 20.

GARCIA-ARENAL, F.; ZAITLIN, M.; PALUKAITIS, P. Nucleotide sequence analysis of six satellite RNAs of cucumber mosaic virus. Primary sequence and secondary structure alternations do not correlate with differences in pathogenicity. *Virology*, San Diego, v. 158, n. 2, p. 339-347, 1987.

GEORGE, E. F. *Plant propagation by tissue culture, part 1 - The Technology*, 2. ed Edington: Exegetics Limited, 1996a. 1574p.

GODINHO, F. de P. *Mudas de bananeiras: tecnologia de produção*. Belo Horizonte: EPAMIG, 1994. 44p. Boletim Técnico, 44.

GOULD, A. R.; PALUKAITIS, P.; SYMONS, R. H.; MOSSOP, D. W. Characterization of a Satellite RNA associated with cucumber mosaic virus. *Virology*, San diego, v. 84, n. 2, p. 443-455, 1978.

GOWER, J. C.; LEGENDER, P. Metric and Euclidean properties of dissimilarity coefficients. *Journal of Classifications*, New York, v. 3, n. 1, p. 5-48, 1986.

GRAPIN, A.; NOYER, J. L.; CARREEL, F.; DAMBIER, D.; BAURENS, F. C.; LANAUD, C.; LAGODA, P. J. L. Diploid *Musa acuminata* genetic diversity assayed with sequence - tagged microsatellite sites. *Electrophoresis*, Berlin, v. 19, p. 1374-1380, 1999.

HAASE, A.; RITCHER, J.; RABENSTEIN, F. Monoclonal antibodies for detection and serotyping of cucumber mosaic virus. *Journal Phytopathology*, Berlin, v. 127, n. 1, p. 129-136, 1989.

HABER, S.; RYMENSON, R. T.; PROCUNIER, J. D. Diagnosis of flame chlorosis by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). *Plant Disease*, St. Paul, v. 79, n. 6, p. 626-630, June 1995.

HABILL, N.; FRANCKI, R. I. B. Comparative studies on tomato aspermy and cucumber mosaic virus. III. Further studies on relationship and construction of a virus from parts of the two viral genomes. *Virology*, San Diego, v. 61, n. 2, p. 443-449, June 1974.

HAYAKAWA, T.; MIZUKAMI, M.; NAKAJIMA, M.; SUZUKI, M. Complete nucleotide sequence of RNA 3 from cucumber mosaic virus strain O: comparative study of nucleotide sequences and amino acid sequences among strains O, Q, D and Y. *Journal Genetic Virology*, Reading, v. 70, n. 2, p. 499-504, Feb. 1989.

HOFFMANN, A. Propagação de plantas frutíferas. Lavras: UFLA / FAEPE, 1998. 282p.

HSU, J. S.; LI, H. P.; BARRY, K.; WANG, M. Compararison of Dot Blot, ELISA, and RT-PCR Assays for Detection of Two Cucumber Mosaic Virus Isolates Infecting Banana in Hawaii. *Plant Disease*, St. Paul, v. 79, n. 9, p.902-906, Sept. 1995.

HSU, J. S.; PANG, S. Z.; SLIGHTOM, J. L. The coat protein genes of squash mosaic virus: Cloning, sequence analysis, and expression in tobacco protoplasts. *Archives Virology*, New York, v. 130, n. 1, p. 17-31, 1993.

ITAL (Campinas, SP). *Banana: cultura, matéria prima, processamento e aspectos econômicos*. 3. ed. Campinas, 1990. 302p. ITAL. *Frutas Tropicais*, 3.

JACQUEMOND, M.; LEROUX, J. L'ARN satellite du virus de la concombre II. Étude de la relation virus-ARN satellite chez divers hôtes. *Agronomie*, v.2, n.1, p. 55, 1982.



JAMES, A. C.; ECHEVERRIA, S. P.; VALENCIA, V. H. The potencial of AFLP to detect genetic differences and somoclonal variantsin Musa spp. *Infomusa*, Montpellier, v. 7, n. 2, p. 3-6, dic. 1998.

KAEMMER, D.; FISCHER, D.; GRAPIN, A.; NOYER, J. L.; CARREEL, F.; DAMBIER, D.; BAURENS, F. C.; LANAUD, C.; LAGODA, P. J. L. Molecular breeding in the genus Musa: a strong case for STMS marker technology. *Euphytica*, Wellingford, v. 96, n. 1, p. 49-63, 1997.

KAPER, J. M.; WATERWORTH, H. E. Cucumovirus. In: KURSTAK, E. (Ed.). *Handbook of plant virus infections and comparative diagnosis*. North Holland, New York: Elsavier, 1981. p.257-332.

KIRANMAI, G.; SATYANARAYANA, T.; SREENIVASULU, P. Molecular cloning and detection of cucumber mosaic cucumovirus causing infectious chlorosis disease of banana using DNA probes. *Current Science*, Bangalore, v. 74, n. 4, p. 356-359, 1998.

KOENING, R.; BURGERMEISTER, W. Applications of immunoblotting in plant virus diagnosis. In: JONES, R. A. C.; TORRANCE, L. *Developments and Applications in virus testing*. Wellesbourne: Association of Applied Biologists, 1986. p.121-137.

KRZANOWSKI, W. J. *Principles of multivariate analysis: a user's perspective*. Oxford: Oxford Science, 1998. 563p.

LEBOT, V.; ARADHYA, K. M. Genetic relationships among cultivated bananas and plantains from Asia and the Pacific. *Euphytica*, Wellington, v. 67, n. 3, p. 163-176, 1993.

LIMA, J. A. A.; GONÇALVES, M. F. Identificação sorológica do vírus do mosaico do pepino em plantações de banana do Ceará. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v. 13, n. 2, p.101, jun. 1988.

LIMA, J. E. O. Produção monitorada de mudas. *Laranja*, Cordeirópolis, v. 15, n.2, p. 251-262, 1999.

LOXDALE, H. D.; BROOKES, C. P.; DE BARROS, P. J. Application of novel molecular markers (DNA) in agricultural entomology. In: SYMONDSON, W. O. C.; LIDDELL, J. E. *The ecology of africultural pests: biochemical approaches*. London: Chapman & Hall, 1996. p.149-212.

LOXDALE, H. D.; LUSHAI, G. Molecular markers in entomology. *Bulletin of Entomological Research*, London, v. 88, n. 6, p. 577-600, Dec. 1998.

MAKI, C. S. Respostas fungistáticas de *Lentinula edodes* sobre *Candida albicans* e análise da variabilidade intraespecífica. 1999. 110p. Dissertação (Mestrado em Genética) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina.

MARTINEZ, J. A.; ARAÚJO, J. M. B.; NÓBREGA, R. S.; AMORIM, A. C. F.; OLIVEIRA, J. R.; REZENDE, S. T. Estudos para produção de mudas de bananeiras variedade Maçã livres do patógeno causador do mal-do-Panamá. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 6., 1981, Recife, PE. Anais... Recife: SBF, 1981. v.1, p. 280-286.

MENEGUCCI, J. L. P. Propagação "in vivo" da bananeira "Prata": efeito de diâmetro de rizomas e doses de 6 – benzilaminopurina. 1993. 54p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Escola superior de Agricultura de Lavras, Laveras, MG.

MOREIRA, R. S.; SAES, L. A. Considerações sobre o banco de germoplasma do IAC. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 7., 1984, Florianópolis. Anais... Florianópolis, SC: SBF / EMPASC, 1984. v. 1, p. 220-236.

MOSSOP, D. W.; FRANCKI, R. I. B. The stability of satellite viral RNA in vivo and in vitro. *Virology*, New York, v. 94, n. 1, p. 243-253, Jan. 1978.

MUMM, R. H.; DUDLEY, J. W. A PC SAS compute program to generate a dissimilarity matrix for cluster analysis. *Crop Science*, Madison, v. 35, n. 3, p. 925 – 927, May/June 1994.

MURPHY, F. A.; FAUQUET, C. M.; BISHOP, D. H. L.; SUMMERS, M. D. *Virus taxonomy*. Sixth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. New York: Springer-Verlag, 1995.

OLIVEIRA, C. M. Variação genética entre populações de *Dalbulus maidis* e mecanismo de sobrevivência na entresafra do milho. 2000. 167p. Tese (Doutorado em Entomologia) - Escola superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, SP.

PALUKAITIS, P. Preparation and use of cDNA probes for detection of viral genomes. In: WEISSBACH, A. & WEISSBACH, H. (Ed.) *Methods for plant molecular biology*. Academic Press, 1998. p.108

PALUKAITIS, P.; ROOSSINCK, M. J.; DIETZGEN, R. G. Cucumber Mosaic Virus. *Virus Research*, Orlando, v. 41, n. 1, p. 281-348, 1992.

PAZ, O. P. da. Caracterização de germoplasma de bananeira com RAPD. 2000. 69 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal da Bahia, Cruz das Almas, Bahia.

PENDEN, K. W. C.; SYMONS, R. H. Cucumber mosaic virus contains a functionally divided genome. *Virology*, New York, v. 53, n. 2, p. 487-492, Feb. 1973.

PÉREZ, R. H.; CASTRO, M.; CARRAZANA, J. C. N.; MOYA, T. P. Diagnostico de CMV por UM-ELISA en el proceso de micropropagacion del platano. *Centro Agrícola, De las Villas*, n. 2, p.88-92, 1995.

PILLARY, M.; OGUNDIWIN, E.; NWAKANMA, D. C.; UDE, G.; TENKOUANO, A. Analysis of genetic diversity and relationships in East African banana germoplasm. *Theoretical and Applied Genetics*, Berlin, v. 102, n. 6 / 7, p. 956-970, 2001.

PORNKULWAT, S.; SKODA, S. R.; THOMAS, G. D.; FOSTER, J. E. Random amplified polymorphic DNA used to identify genetic variation in ecotypes of the European corn borer. *Annals of the Entomological Society of America*, Lanham, v. 91, n. 5, p. 719-725, Sept. 1998.

POWELL, P.; MORGANTE, M.; ANDRE, C.; HANAFEY, M.; VOGEL, J.; TINGEY, S.; RAFALSKI, A. The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR markers for germoplasm analysis. *Molecular Breeding*, Dordrecht, v. 2, n. 3, p. 225-238, 1996.

RIZZO, H.; GUNN, L. V.; PARES, R. D.; GILLINHS, M. R. Differentiation of cucumber mosaic virus isolates using the polymerase chain reaction. *Journal Genetic Virology*, Reading, v. 73, n. 8, p. 2099-2103, Aug. 1992.

SAIKI, R. K.; DAL BÓ, E.; GHIRINGHELLI, P. D.; MEDRANO, C.; ROMAMNOWSKI, V. Cloned cDNA probes for the detection of tomato spotted wilt virus. *Phytopathology*, St. Paul, v. 79, n. 11, p. 1309-1313, Nov. 1989.

SALDARELLI, P.; BARBAROSSA, L.; GRIECO, F.; GALLITELLI, D. Digoxigenin-labeled riboprobes applied to phytosanitary certification of tomato in Italy. *Plant Disease*, St. Paul, v. 80, n. 12, p. 1343-1346, Dec. 1994.



- SALDARELLI, P.; MINAFRA, A.; MARTELLI, G. P. Detection of grapevine leafroll-associated closterovirus III by molecular hybridization. *Plant Pathology*, St. Paul, v. 47, n. 6, p. 780-786, Dec. 1994.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. *Molecular Cloning: a laborarotry manual*. 2. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989.
- SHEPHERD, K. *Evolução e classificação das bananeiras*. Cruz das Almas, BA: EMBRAPA – CNPMF, 1984. 4p.
- SHEPHERD, K. Observations on *Musa* taxonomy. In: IDENTIFICATION OF GENETIC DIVERSITY IN THE GENUS MUSA, 1988, Los Baños. *Proceedings...* Montpellier: INIBAP, 1990. p. 158 – 165.
- SHEPHERD, K.; ALVES, E. J.; FERREIRA, F. R. Classificação dos acessos do banco de germoplasma de banana do CNPMF. In CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 7., 1984, Florianópolis. *Anais...* Florianópolis, SC: SBF/EMPASC, 1984. v. 1, p. 213 – 219.
- SILVA, C. R. *Fruticultura tropical*. Lavras: UFLA/FAEPE, 1998. 378p.
- SIMMONDS, N. W. *Los platanos*. Barcelona: Blume, 1973. 539p.
- SIMMONDS, N. W. Varietal identification in the Cavendish group of bananas. *Journal Horticultural Science*, Ashford, v. 29, p. 81-88, 1954.
- SIMMONDS, N. W.; SHEPHERD, K. The taxonomy and origins of the cultivated bananas. *The Journal of the Linnean Society of London*, London, v. 55, p. 302-312, 1995.
- SINGH, Z.; JONES, R. A. C.; JONES, M. G. K. Identification of Cucumber Mosaic Virus Subgroup I Isolates from banana plants affected by infections chlorosis disease using RT-PCR. *Plant Disease*, St. Paul, v. 79, n. 7, p. 713-716, July 1995.
- STOVER, R. H.; SIMMONDS, N. W. *Bananas*. 3. ed. New York: Longman, 1987. 468p.
- SUAZO, A.; McTIERNAM, R.; HALL, H. G. Differences between african and european honey bee in randon amplified polymorphic DNA. *Journal of Heredity*, v. 89, n. 1, p. 32 – 36, 1998.

**SYMONDSON, W. O. C.; LIDDELL, J. E.** The ecology of agricultural pests: biochemical approaches. London: Chapman & Hall, 1996. 517p.

**TALIANSKI, M. E.; GARCIA-ARENAL, F.** Role of cucumovirus capsid protein in long-distance movement within the infected plant. **Journal Genetic Virology, Reading**, v. 69, n. 2, p. 916-922, Feb. 1995.

**TENKOUANO, A.; CROUCH, J. H.; CROUCH, H. K.; ORTIZ, R.** Comparison of DNA marker and pedigree – based methods of genetic analysis of plantain and banana clones. I. Estimation of genetic relationships. **Theoretical and Applied Genetics, Berlin**, v. 98, n. 1, p. 98-68, 1999.

**TENKOUANO, A.; CROUCH, J. H.; CROUCH, H. K.; ORTIZ, R.** Genetic diversity hybrid performance, and combining ability for yield in *Musa* germoplasm. **Euphytica, wellingfor**, v. 102, n. 3, p. 281-288, 1998.

**THORMANN, C. E.; FERREIRA, M. E.; CAMARGO, L. E. A.; TIVANG, J. G.; OSBORN, T. C.** Comparison of RFLP and RAPD marked to estimating genetic relationship within and among cruciferous species. **Theoretical and Applied Genetics, Berlin**, v. 88, n. 8, p. 973-980, 1994.

**TINGEY, S. V.; TUFO, J. P. DEL.** Genetic analysis with random amplified polymorphic DNA marked. **Plant Physiology, Rockville**, v. 101, n.2, p. 349-352, Apr. 1993.

**TOMLINSON, J. A.; CARTER, A. L.; DALE, W. T. SIMPSON, C. J.** Weed plants as sources of cucumber mosaic virus. **Annals of Applied Biology, Cambridge**, v. 66, n. 1, p. 11-16, Aug. 1970.

**TRINDADE, D. R.; POLTRONIERI, L. S.; ALBUQUERQUE, F. C.; BENCHIMOL, R. L.** Ocorrência do vírus do mosaico do pepino em bananeiras no estado do Pará. **Fitopatologia Brasileira, Brasília**, v. 23, n. 2, p.185-187, jun. 1998.

**TRUTA, A. A. C.** Detecção simultânea de vírus em batata por DAS-ELISA e determinação do material vegetal ideal a ser utilizado em programas de indexação. 1997. 58p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

**TSENG, C.; TING, E.; JOHNSON, D.; SALUTA, M.; DUNST, R.** Use of RAPD fingerprinting for differentiating *E. coli* isolates from human and animal sources. **Life Science News, London**, n. 7, p.10-11, 2001.

VAN REGENMORTEL, M. H. V.; BURCKARD, J. Detection of a wide spectrum of tobacco mosaic virus strain by indirect enzyme immunosorbent assays (ELISA). *Virology*, San Diego, v.106, n. 2, p. 327-334, 1980.

VICENTE, J. R.; PEREZ, L.H. Análise econométrica da oferta e demanda de banana no Brasil. *Agricultura em São Paulo*, São Paulo, v. 45, t.1, p.59-68, 1998.

VOLLER, A.; BARTLETT, A.; ADAMS, A. N. The detection of viruses by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). *Journal of General Virology*, Reading, v. 33, n. 10, p. 165-167, Oct. 1976.

WELSH, J.; McCLELLAND, M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitray primers. *Nucleic Acids Research*, Oxford, v. 18, n. 24, p. 7213-7218, Dec. 1990.

WIER, B. S. *Genetic data analysis: methods for discrete population genetic data*. Massachusetts, Sunderland: Sinauer, 1990. 377p.

WILLIAMS, J. G. K.; KUBELIK, A. R.; LIVAK, K. J.; RAFALSKI, J. A.; TINGEY, S. V. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetics markers. . *Nucleic Acids Research*, Oxford, v. 18, n. 22, p. 6531-6535, Nov. 1990.

WU, M. L.; HUNG, T. H; SU, H. J. Strain differentiation of cucumber mosaic virus associated with banana mosaic disease in Taiwan. *Annual Phytopathology Society Japan*, Tokyo, v. 63, p. 176-178, 1997.

ZAMBOLIM, E. M. *Caracterização Biológica e Molecular do Vírus do Mosaico do Pepino (CMV) isolado do tomateiro, Função da Proteína Capsidial na movimentação intercelular do vírus e construção transgênicas para resistência do tomateiro ao CMV*. 1997. 97p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

**CAPÍTULO I: CERTIFICAÇÃO GENÉTICA DE MATRIZES E MUDAS  
MICROPROPAGADAS E ESTUDO DA DIVERGÊNCIA GENÉTICA  
ENTRE CULTIVARES DE BANANEIRA POR MEIO DE  
MARCADORES RAPD**

**RESUMO**

Gomes, G. A. C. **Certificação genética de matrizes e mudas micropropagadas e estudo da divergência genética entre cultivares de bananeira por meio de marcadores RAPD.** Lavras: UFLA, 2002. 127 p. (Tese de Doutorado em Agronomia).

O objetivo deste trabalho foi estabelecer uma metodologia simples, barata e eficiente, baseada em marcadores moleculares RAPD, para a certificação genética de mudas micropropagadas de bananeiras, bem como estudar a divergência genética entre as 19 cultivares de bananeiras estudadas. As distâncias genéticas foram obtidas pela porcentagem de discordância entre as cultivares e a representação gráfica destas distâncias foi realizada através de um dendrograma (método UPGMA). Foram obtidos ainda, os valores de correlação por análise tipo Bootstrap e os valores de PIC para os primers utilizados. Verificou-se que os marcadores RAPD foram eficientes na separação das cultivares, de acordo com o seu grupo genômico. Através dos valores de correlação obtidos, verificou-se que a utilização de 108 bandas polimórficas foi suficiente para estabelecer as distâncias genéticas entre as cultivares em estudo, pois a partir de 58 bandas polimórficas não houve diferenças significativas nos valores das distâncias genéticas ou no agrupamento das cultivares no dendrograma. Os valores de PIC demonstraram o alto conteúdo informativo dos primer RAPD utilizados neste estudo. Através da utilização de 7 primers RAPD foi possível identificar todas as 19 cultivares apreciadas neste estudo. Portanto, os marcadores moleculares RAPD podem ser utilizados em programas de certificação genética de mudas de bananeiras.

---

Comitê Orientador: Renato Paiva-UFLA (Orientador), Edilson Paiva-EMBRAPA Milho e Sorgo, Elizabeth de Oliveira-EMBRAPA Milho e Sorgo e Newton Portilho Carneiro-EMBRAPA Milho e Sorgo.

## ABSTRACT

Gomes, G. A. C. **Genetic certification of donor plants and plantlets micropropagated and genetic divergence study among banana cultivars by RAPD markers.** Lavras: UFLA, 2002. 127p. (Doctorate Thesis in Agronomy).

The objective of this paper was to establish simple, cheap and efficient methodology based in RAPD markers, for genetic certification of micropropagated banana plantlets, as well as to study a genetic divergence among 19 cultivars of banana plants. The genetic distances, for the genetic divergence study, were obtained by discordance percentage among cultivars and the distance graphic representation was determined by a dendrogram (UPGMA method). It was also obtained correlation values by Bootstrap analysis and PIC values for the used primers. It was verified that RAPD markers were efficient to separate cultivars, according to their genomic group. Based on the correlation values, the use of 108 polymorphic bands were sufficient to establish genetic distances among cultivars once that with the use of more than 58 polymorphic band, no significative differences in genetic distances values or in cultivars grouping in dendrogram were observed. The PIC values showed high informative content according to RAPD primers used. Using 7 RAPD primers it was possible to identify all the 19 cultivars evaluated in this work. Thus, the RAPD molecular markers can be used in programs of genetic certification of banana plantlets.

---

Guidance Committee: Renato Paiva-UFLA (Major Professor), Edilson Paiva-EMBRAPA Milho e Sorgo, Elizabeth de Oliveira - EMBRAPA Milho e Sorgo and Newton Portilho Carneiro-EMBRAPA Milho e Sorgo.

## 1 INTRODUÇÃO

Vários autores têm procurado classificar e descrever as principais cultivares de banana. Mundialmente, a primeira descrição foi feita por Simmonds (1973) em Trinidad, utilizando marcadores morfológicos. Trabalhos semelhantes foram conduzidos em vários países, inclusive no Brasil por Alves (1984).

No entanto, a utilização apenas de marcadores morfológicos não é suficiente para identificar, com segurança, todas as cultivares de bananeiras utilizadas no Brasil. Por tanto, a identificação dos materiais genéticos utilizados para a produção de mudas micropropagadas de bananeira é realizada de maneira empírica, observando-se as características morfológicas da planta matriz.

Isto pode levar a erros de identificação de cultivares, ocasionando enormes prejuízos tanto para o produtor de mudas quanto para o próprio produtor de frutos.

Sabe-se que o agronegócio de produção mudas é baseado numa estreita relação de confiança entre o produtor / vendedor de mudas e seus clientes, e que um deslize dessa natureza pode acabar com a idoneidade do laboratório, podendo levá-lo até a falência.

A portaria nº 095 / 94 do Instituto Mineiro de Agropecuária que dispõe sobre as Normas e Padrões para a produção de mudas certificadas de bananeiras, não estabelece a forma pela qual deve-se garantir a certificação genética das mudas comercializadas.

Visando sanar tal deficiência este trabalho teve por objetivo estabelecer uma metodologia simples, barata e eficiente, baseada em marcadores moleculares RAPD, para a certificação genética de matrizes e mudas micropropagadas de bananeiras, bem como estudar a divergência genética entre as 19 cultivares estudadas.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Biologia Molecular do Núcleo de Biologia Aplicada (NBA) da EMBRAPA Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG.

### 2.1 EXPERIMENTO I. Estudo da divergência genética entre cultivares de bananeiras por meio de marcadores RAPD.

#### 2.1.1 Cultivares analisadas

Para a realização deste trabalho foi estabelecida uma coleção com 19 cultivares de bananeiras (Tabela 1), sendo que para cada cultivar foram mantidas em casa de vegetação, quatro plantas cultivadas separadamente em vasos de 10 Litros contendo substrato comercial (terra de Holambra).

Tabela 1. Coleção de cultivares de bananeiras utilizadas no presente estudo. EMBRAPA Milho e Sorgo, Sete Lagoas - MG, 2002.

CULTIVARES	GRUPO GENÔMICO	ORIGEM
FHIA - 01	AAAB	EPAMIG - LAVRAS
FHIA - 18	AAAB	MULTIPLANTA
SH - 3640	AAAB	MULTIPLANTA
PIONEIRA	AAAB	EPAMIG - LAVRAS
OURO DA MATA	AAAB	UFLA
GRAND NAINÉ	AAA	BIOCELL
CAPIRA	AAA	BIOCELL
NAM	AAA	EPAMIG - LAVRAS
NANICÃO	AAA	UFLA
MAÇÃ	AAB	BIOCELL
MAÇÃ GRANDE	AAB	MULTIPLANTA
PRATA ANÃ	AAB	BIOCELL
PRATA COMUM	AAB	UFLA
PACOVÃ	AAB	UFLA
MYSORE	AAB	UFLA
FIGO	ABB	MULTIPLANTA
PRATA ZULU	ABB	UFLA
MARMELO	AAB	UFLA
OURO	AA	BIOCELL

### **2.1.2 Extração e quantificação do DNA genômico**

Para a extração do DNA, 1 g de tecido foliar fresco foi triturado em N<sub>2</sub> líquido. Em seguida, o material foi transferido para tubo de centrifuga juntamente com 10 mL de tampão de extração (1 M Tris pH 7,5; 0,5 M EDTA pH 8,0; 5 M NaCl; 1% CTAB; 2% β - Mercaptoetanol) e incubado a 65°C em banho maria por 1 hora, sendo homogeneizada a cada 15 minutos. Após esse período foram adicionados 10 mL da mistura clorofórmio : octanol (24:1), sendo gentilmente homogeneizada por 10 minutos. A separação das fases orgânica e aquosa foi realizada por centrifugação a 3000 rpm por 10 minutos, sendo o sobrenadante transferido para outro tubo e o DNA precipitado adicionando-se 6 mL de isopropanol gelado. O precipitado foi removido com anzol de vidro para outro tubo contendo 3 mL de TE pH 8,0 (0,01 M Tris pH 8,0; 0,001 M EDTA pH 8,0), onde permaneceu incubado a temperatura ambiente por 2 horas. O DNA foi novamente precipitado adicionando-se 150 µL de NaCl e 3mL de etanol gelado, sendo removido com anzol de vidro e transferido para eppendorf com 500 µL de TE pH 8,0.

A quantificação do DNA foi realizada em gel de agarose 0,8% por comparação com padrões de DNA de concentração conhecida. A eletroforeses foi realizada a 150 V em tampão TAE (1mM EDTA pH 8,0; 40 mM TRIS pH 8,0; 20 mM ácido acético) e o gel tratado com brometo de etídio (10%) durante 20 minutos, sendo visualizado sob luz ultravioleta e a imagem do gel captada pelo sistema de documentação “Eagle Eye” (Stratagene, La Jolla, CA, USA).

### **2.1.3 Amplificação via RAPD**

A reação de amplificação foi realizada em volume final de 25 µL contendo 50 ng de DNA; 2,5 µL tampão PCR 10 X; 2,5 mM dNTPs; 1 U de Taq polimerase e 1 µL primer (4µM).



Após o preparo, as reações foram submetidas ao termociclador GeneAmp PCR System 9600 (Applied Biosystem, Palo Alto, CA, USA) programado com uma temperatura de desnaturação inicial de 95°C por 1 minuto, seguido de 35 ciclos de amplificação compostos de 3 etapas, sendo a primeira de 94°C por 10 segundos para a desnaturação da fita de DNA, uma de 36°C por 1 minuto para promover o anelamento dos primers, e o último passo de 72°C por 2 minutos, para a extensão e incorporação dos nucleotídeos. Após os 35 ciclos, as amostras foram submetidas a uma etapa final de 7 minutos a 72°C.

Ao final das reações, os produtos amplificados foram separados a 150 V em gel de agarose 1,0%. Após a eletroforese, o gel foi incubado em solução de brometo de etídio (10%) durante 20 minutos, sendo visualizado sob luz ultravioleta e as imagens captadas pelo sistema de fotodocumentação “Eagle Eye” (Stratagene, La Jolla, CA, USA).

Uma pré-seleção de foi realizada, submetendo a cultivar Pioneira a 500 primers RAPD da “Operon Technologies” (Alameda, CA, EUA).

#### 2.1.4 Avaliação dos dados moleculares

Na avaliação dos géis, cada banda foi tratada como um loco único, sendo que a sua presença em um indivíduo foi designada por 1 e sua ausência por 0. Desta maneira, foi possível construir uma matriz binária de zero e um.

A estimativa da dissimilaridade genética ( $DG_{xy}$ ) entre as cultivares foi efetuada pelo coeficiente de porcentagem de discordância, calculada pela expressão :  $DG_{xy} = (n^0 x_i \neq y_i) / i$ , onde  $i$  = número total de bandas utilizadas.

A representação gráfica das distâncias foi feita através de um dendrograma obtido pelo método hierárquico aglomerativo da média aritmética entre pares não ponderados (UPGMA), com auxílio do programa STATISTICA – PC versão 4.5.

A informatividade de cada primer utilizado ( $I_{pij}$ ) foi determinada através da equação:  $I_{pij} = 1 - \sum_i \sum_j pij^2$ .

A fim de se verificar o número mínimo de marcadores polimórficos para gerar uma estimativa precisa da dissimilaridade genética entre as cultivares, a análise tipo “Bootstrap” foi realizada segundo a metodologia descrita por Efron (1981), agrupando-se ao acaso 18 marcadores polimórficos na primeira análise e para as demais análises foram acrescentados 10 marcadores sucessivamente até a utilização de todos os marcadores polimórficos, implementado pelo programa GQ Mol.

## **2.2 EXPERIMENTO II. Diferenciação de cultivares de bananeira utilizando marcadores RAPD.**

Para a realização deste estudo foram utilizadas as mesmas 19 cultivares empregadas no estudo da divergência genética (Tabela 1), sendo utilizadas as mesmas metodologias de extração e quantificação dos DNAs. Os primers utilizados para a diferenciação das cultivares foram escolhidos segundo os padrões polimórficos obtidos pelo estudo anterior, seguindo o mesmo protocolo de amplificação e visualização das bandas.

### **2.3. EXPERIMENTO III. Certificação genética de mudas micropropagadas de bananeiras utilizando marcadores RAPD: Estudo de Caso.**

#### **2.3.1 Estudo de Caso I. Confirmação de contaminação genética pela cv. Prata Anã em um lote de meristemas isolados da cv. Maçã.**

O laboratório de produção de mudas de bananeiras BIOCELL isolou e enviou um lote de 2.660 plântulas da cv. Maçã para a empresa Multiplanta Tecnologia Vegetal.

Durante o processo de aclimatação das mudas, foi comprovada visualmente, utilizando-se o marcador morfológico mancha na folha (presente na cultivar Prata e ausente na cultivar Maçã), que havia uma provável contaminação no lote de mudas da cultivar Maçã pela cultivar Prata. Assim, o presente estudo teve por objetivo comprovar a identidade genética das mudas obtidas a partir deste lote de meristemas isolados pela BIOCELL, utilizando-se marcadores RAPD.

Os materiais genéticos utilizados para a avaliação foram 8 plantas do lote suspeito, provavelmente da cultivar Maçã (M1 a M8), 10 plantas do lote suspeito, provavelmente da cultivar Prata Anã (P1 a P10), 1 planta Maçã (E1) (controle BIOCELL), 1 planta Prata Anã (E2) (controle BIOCELL), 1 planta Maçã (M) (controle NBA), 1 planta Prata Anã (PA) (controle NBA) e 1 planta Prata Comum (PC) (controle NBA).

Os processos de extração, quantificação e amplificação e visualização do DNA foram realizados conforme descrito anteriormente.

### **2.3.2 Estudo de Caso II. Certificação da identidade genética de 40 amostras de folhas de bananeiras.**

A empresa Multiplanta Tecnologia Vegetal enviou um lote contendo 40 amostras de folhas retiradas de mudas micropropagadas de bananeiras. As amostras foram recebidas sem as respectivas identificações, sendo apenas enumeradas de 1 a 40. Foi informado apenas que o lote era constituído por amostras pertencentes às cultivares de bananeiras Grand Naine, Maçã, SH-3640 e Prata Anã. Portanto, coube a este estudo verificar a identidade genética das 40 amostras, utilizando marcadores RAPD.

Como padrões comparativos para as quatro cultivares, foram utilizados DNAs extraídos de folhas de bananeiras da coleção estabelecida no Núcleo de Biologia Aplicada da EMBRAPA Milho e Sorgo. Os processos de extração, quantificação e amplificação do DNA foram realizados conforme descrito anteriormente.

## **3 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **3.1 EXPERIMENTO I. Divergência genética entre cultivares de bananeira por meio de marcadores RAPD.**

Neste estudo, foram selecionados 19 primers que geraram, pelo menos, uma banda polimórfica entre as cultivares analisadas (Tabela 2). Tais 19 primers geraram 108 bandas, com uma média de 8,0 bandas por primer, das quais 65 foram polimórficas (60%) e 43 foram monomórficas (40%). O número de bandas polimórficas variou de um para o primer OPY 06 até dez para o primer OPW 04, cujo padrão de amplificação está representado na figura 2.

TABELA 2. Primers utilizados e suas respectivas seqüências de bases. EMBRAPA Milho e Sorgo, Sete Lagoas - MG, 2002.

PRIMERS	SEQUÊNCIA (5' - 3')
OPB 10	CTGCTGGGAC
OPB 11	GTAGACCCGT
OPB 12	CCTTGACGCA
OPE 15	ACGCACAACC
OPE 18	GGA CTGCAGA
OPF 04	GGTGATCAGG
OPI 03	CAGAAGCCCA
OPY 06	AAGGCTCACC
OPY 15	AGTCGCCCTT
OPZ 12	TCAACGGGAC
OPZ 15	CAGGGCTTTC
OPZ 17	CCTTCCCACT
OPZ 19	GTGCGACAAA
OPW 02	ACCCCGCCAA
OPW 03	GTCCGGAGTG
→ OPW 04	CAGAAGCGGA
OPW 07	CTGGACGTCA
OPW 08	GACTGCCTCT
OPW 16	CAGCCTACCA

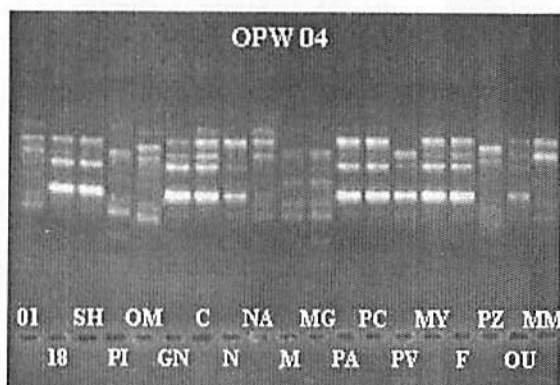


FIGURA 2. Padrões de amplificação obtidos com o primer RAPD OPW 04, em gel de agarose 1,0%. (01: FHIA-01; 18: FHIA-18; SH: SH 3640; PI: Pioneira; OM: Ouro da Mata; GN: Grand Naine; C: Caipira; N: Nam; NA: Nanicão; M: Maçã; MG: Maçã Grande; PA: Prata Anã; PC: Prata Comum; PV: Pacovan; MY: Mysore; F: Figo; PZ: Prata Zulu; OU: Ouro; MM: Marmelo). EMBRAPA Milho e Sorgo, Sete Lagoas - MG, 2002.

O nível de polimorfismo obtido foi superior ao relatado por Paz (2000), em seus estudos com bananeiras, o que pode ser explicado uma vez que o polimorfismo é dependente do grau de divergência entre os genótipos estudados. Além disso, a pré-seleção dos primers em função da qualidade e do número de produtos amplificados pode ter contribuído para a elevação do polimorfismo obtido.

As 108 bandas polimórficas utilizadas podem ser consideradas suficientes para uma adequada avaliação da divergência, uma vez que nas análises de “bootstrap” realizadas verificou que a correlação não variou significativamente, a partir da utilização de 58 bandas polimórficas (Figura 3). Portanto, a partir de 58 bandas polimórficas, a correlação entre as matrizes de distância aproxima-se de 1 e a soma dos quadrados dos desvios reduz-se a 0,2. Assim, o aumento do número de bandas não altera significativamente, a estimativa da distância genética entre os indivíduos estudados.

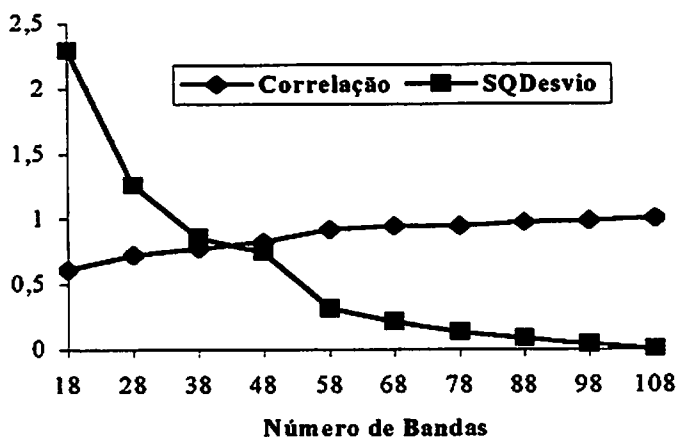


FIGURA 3. Análise de “bootstrap” para a estimativa das distâncias genéticas entre as 19 cultivares de bananeiras estudadas, utilizando diferentes números de bandas polimórficas. EMBRAPA Milho e Sorgo, Sete Lagoas - MG, 2002.

Com base nas 108 bandas polimórficas RAPD obtidas, foi construída uma matriz de distância genética, a partir da porcentagem de discordância, relacionando todos os pares de cultivares (Tabela 3).

A distância genética média para as 189 distâncias obtidas foi de  $0,352 \pm 0,02$ , com uma amplitude de 0,565 a 0,139. Sendo a maior distância obtida entre as cultivares Caipira (AAA) e Marmelo (ABB), pertencentes a grupos genômicos bem distintos, uma vez que na cultivar Caipira ocorre a predominância do genoma A (*M. acuminata*), ao contrário da cultivar Marmelo, onde predomina o genoma B (*M. balbisiana*). A menor distância foi observada entre as cultivares tetraplóides (AAAB) Pioneira e Ouro da Mata (Tabela 3).

TABELA 3. Matriz de distâncias genéticas entre as cultivares de bananeiras analisadas dois a dois. FHIA – 01 (01); FHIA – 18 (18); SH – 3640 (SH); Pioneira (PI); Ouro da Mata (OM); Grand Naine (GN); Caipira (C); Nam (N); Nanicão (NA); Maçã (M); Maçã Grande (MG); Prata Anã (PA); Prata Comum (PC); Pacovã (PV); Mysore (MY); Figo (F); Prata Zulu (PZ) e Marmelo (MM). EMBRAPA Milho e Sorgo, Sete Lagoas - MG, 2002.

	01	18	SH	PI	OM	GN	C	N	NA	M	MG	PA	PC	PV	MY	F	PZ	OU	MM
01	0																		
18	0,315	0																	
SH	0,324	0,287	0																
PI	0,287	0,250	0,278	0															
OM	0,204	0,222	0,269	0,139	0														
GN	0,269	0,231	0,241	0,204	0,157	0													
C	0,352	0,389	0,361	0,343	0,315	0,250	0												
N	0,315	0,241	0,250	0,269	0,241	0,157	0,185	0											
NA	0,333	0,315	0,343	0,324	0,241	0,231	0,185	0,185	0										
M	0,444	0,444	0,454	0,324	0,389	0,398	0,389	0,370	0,370	0									
MG	0,407	0,370	0,343	0,287	0,333	0,324	0,389	0,298	0,389	0,185	0								
PA	0,278	0,296	0,306	0,343	0,278	0,213	0,278	0,259	0,222	0,426	0,370	0							
PC	0,352	0,259	0,324	0,324	0,259	0,194	0,315	0,241	0,204	0,370	0,315	0,148	0						
PV	0,435	0,324	0,315	0,370	0,324	0,259	0,361	0,324	0,250	0,380	0,380	0,269	0,157	0					
MY	0,380	0,306	0,426	0,389	0,287	0,333	0,343	0,324	0,306	0,417	0,361	0,287	0,250	0,296	0				
F	0,472	0,454	0,426	0,426	0,435	0,444	0,528	0,380	0,509	0,380	0,324	0,472	0,417	0,407	0,388	0			
PZ	0,472	0,454	0,426	0,444	0,435	0,407	0,417	0,361	0,417	0,343	0,343	0,435	0,380	0,333	0,370	0,277	0		
OU	0,343	0,324	0,296	0,315	0,269	0,241	0,306	0,269	0,324	0,361	0,324	0,306	0,343	0,333	0,388	0,388	0,370	0	
MM	0,491	0,491	0,444	0,481	0,491	0,444	0,565	0,472	0,491	0,380	0,380	0,528	0,454	0,388	0,518	0,259	0,333	0,425	0



O dendrograma obtido com marcadores RAPD apresentou uma tendência em agrupar as cultivares em função do grupo genômico das mesmas (Figura 4).

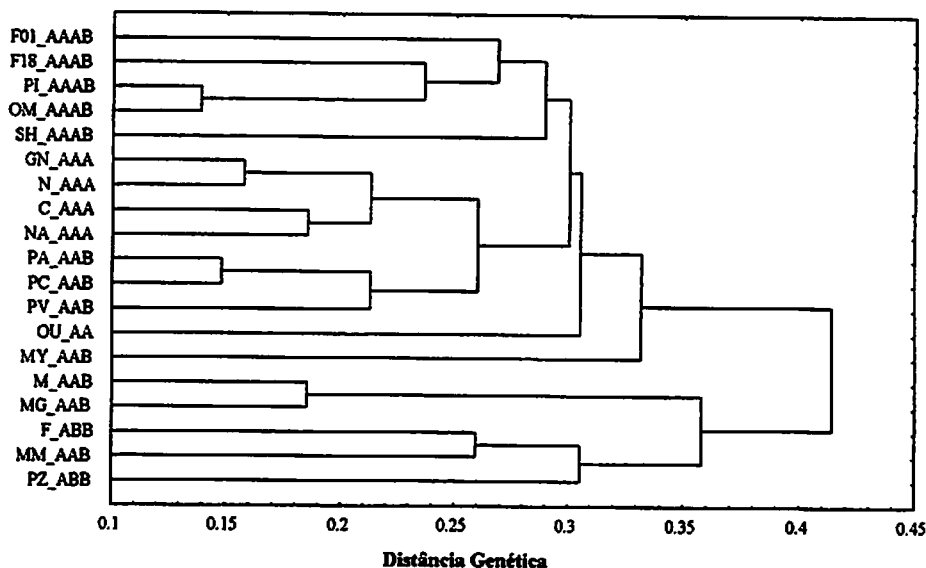


FIGURA 4. Dendrograma das distâncias genéticas entre as cultivares de bananeiras, gerado pelo método UPMG. FHIA - 01 (F01); FHIA - 18 (F 18); SH - 3640 (SH); Pioneira (PI); Ouro da Mata (OM); Grand Naine (GN); Caipira (C); Nam (N); Nanicão (NA); Maçã (M); Maçã Grande (MG); Ouro (OU); Prata Anã (PA); Prata Comum (PC); Pacovã (PV); Mysore (MY); Figo (F); Prata Zulu (PZ) e Marmelo (MM). EMBRAPA Milho e Sorgo, Sete Lagoas - MG, 2002.

Os híbridos AAAB (FHIA-01; FHIA-18, Ouro da Mata, SH-3640 e Pioneira) foram agrupados em um mesmo grupo, provavelmente por serem todos híbridos originados do mesmo progenitor feminino Prata Anã.

Dentro do grupo formado pelas cultivares AAA, as cultivares Caipira e Nanicão apresentaram uma similaridade genética de 82%, devido a origem africana das duas cultivares. É importante salientar que a cultivar Nanicão é uma mutação ocorrida em São Paulo da cultivar Nanica, cuja origem também é africana. As cultivares Grand Naine e Nam foram agrupadas próximas apresentando uma similaridade genética de 84%.

Alves (1999) afirma que a origem da Grand Naine seria do mesmo clone que originou, por mutação, as cultivares Giant Cavendish e Willians Hybrids, e a Nanica seria originada de um clone diferente.

Uma formação interessante observada no dendrograma foi à separação do grupo AAB em dois subgrupos diferentes. No primeiro foram agrupadas as cultivares Prata Anã, Prata Comum e Pacovan pertencentes ao subgrupo Prata. Explica-se a proximidade genética encontrada entre Prata Comum e Pacovan pelo fato da cultivar Pacovan ser um mutante da Prata Comum. Como a Prata Anã também é um mutante da Prata Comum, justifica-se ela também ter sido agrupada junto com as outras duas.

O segundo grupo de cultivares AAB foi formado pelas duas cultivares pertencentes ao subgrupo Maçã (Maçã e Maçã Grande) e pela cultivar Mysore. O agrupamento dessas duas cultivares é decorrente do fato que a Maçã Grande é uma cultivar derivada da Maçã, apenas quanto ao porte, uma vez que seus frutos são muito semelhantes quanto ao sabor e forma.

Justifica-se o agrupamento da cultivar Mysore apesar de não fazer parte diretamente do subgrupo, apresenta-se junto às cultivares Prata, provavelmente por apresentar características de fruto muito semelhantes. Seus frutos são roliços e gordos com a parte terminal em forma de gargalo de garrafa.

A cultivar Marmelo (AAB) foi agrupada separadamente das demais cultivares AAB e junto a cultivar Figo (ABB). Tal agrupamento pode ser justificado uma vez que apresentam características morfológicas bem distintas

das demais cultivares AAB. As cultivares Marmelo e Figo pertencentes ao subgrupo Bluggoe e são conhecidas como “bananas de fritar” devido ao alto teor de amido em seus frutos. Outra característica que diferencia bem o subgrupo Bluggoe é a presença de quinas salientes nos frutos mesmo no ponto de colheita. A cultivar Prata Zulu foi agrupada neste grupo provavelmente por pertencer ao mesmo grupo genômico (ABB) da cultivar Figo.

Devido ser a única representante do grupo genômico (AA), a cultivar Ouro foi colocada agrupada separadamente das demais, não participando de nenhum dos agrupamentos.

A informatividade dos 19 primers utilizados variou de 0,9628 (OPW 04) a 0,1884 (OPY 06) (Tabela 5). O primer OPW 04 foi considerado muito informativo por apresentar um valor de PIC de 0,9628. Tal valor superou o obtido por Tenkouano et al. (1999) em seus estudos de análise genética em clones de bananeiras utilizando marcadores microssatélites.

Pillary et al. (2001), trabalhando com 29 cultivares de bananeiras de regiões montanhosas do leste africano e duas *M. acuminata*, Calcutta 4 e Agbagba, conseguiu, apesar da estreita base genética, separar através de marcadores RAPD, todas as cultivares montanhosas africanas. Seu dendrograma foi composto por um grupo maior contendo as cultivares AAA e a cultivar Agbagba (AAB) e um grupo menor composto por cultivares diplóides AB, inclusive a Calcutta 4. Inferiu ainda que, as cultivares dessa região montanhosa do leste africano tem como origem as cultivares Agbagba e Calcutta 4.

Para o estudo da divergência genética de 57 cultivares de bananeiras indianas, pertencentes a 6 grupos genômicos (AA, AB, AAA, AAB, ABB, ABBB), Bhat e Jarret (1995) através da utilização de 49 primer RAPD (360 bandas polimórficas) concluíram que a base genética das cultivares indianas é bem mais ampla do que a africana e a asiática. O dendrograma obtido a partir destes dados claramente apresentou uma divisão em seis “clusters”, sendo que

no primeiro “cluster” foi agrupada a *M. acuminata* selvagem (AA), no segundo grupo as AB, no terceiro todas as AAA e no quarto grupo 16 cultivares AAB, dentre elas a Mysore. O quinto grupo formado incluiu as cultivares Agni e Myndoli, ambas AAB e no sexto grupo agruparam-se todas as cultivares ABB, ABBB e BB. Vários desses grupos estão em concordância com os estudos isoenzimáticos realizado por Lebot et al. (1993). Apenas as cultivares Mysore e Walha, ambas AAB, foram agrupadas junto ao grupo ABB no estudo isoenzimático. Segundo Lebot (1993), isto ocorreu devido à similaridade existente entre os dois grupos genômicos.

Outro objetivo dos estudos realizados por Bhat e Jarret (1995) foi a identificação das 57 cultivares através de marcadores RAPD. Dos 49 primers utilizados, apenas 12 foram suficientes para diferenciar e identificar todas as cultivares em estudo.

TABELA 5. Primers utilizados no estudo de divergência genética e seus respectivos Polymorphic index content (PIC). EMBRAPA Milho e Sorgo, Sete Lagoas - MG, 2002.

PRIMER	PIC	PRIMER	PIC
OPW 04	0,9628	OPI 03	0,8894
OPW 03	0,9431	OPB 11	0,8319
OPZ 15	0,9383	OPB 12	0,8145
OPZ 19	0,9371	OPE 18	0,7476
OPW 07	0,9296	OPE 15	0,6752
OPW 16	0,9282	OPZ 12	0,5381
OPB 10	0,9219	OPF 04	0,5139
OPW 08	0,9115	OPZ 17	0,2359
OPY 15	0,9106	OPY 06	0,1884
OPW 02	0,8964		

### 3.2 EXPERIMENTO II. Diferenciação de cultivares de bananeira utilizando marcadores RAPD.

Utilizando sete primers RAPD (OPW 04, OPW 07, OPW 08, OPW 16, OPZ 12, OPI 03 e OPY 15) foi possível diferenciar todas as 19 cultivares de bananeiras avaliadas neste estudo (Figura 5).

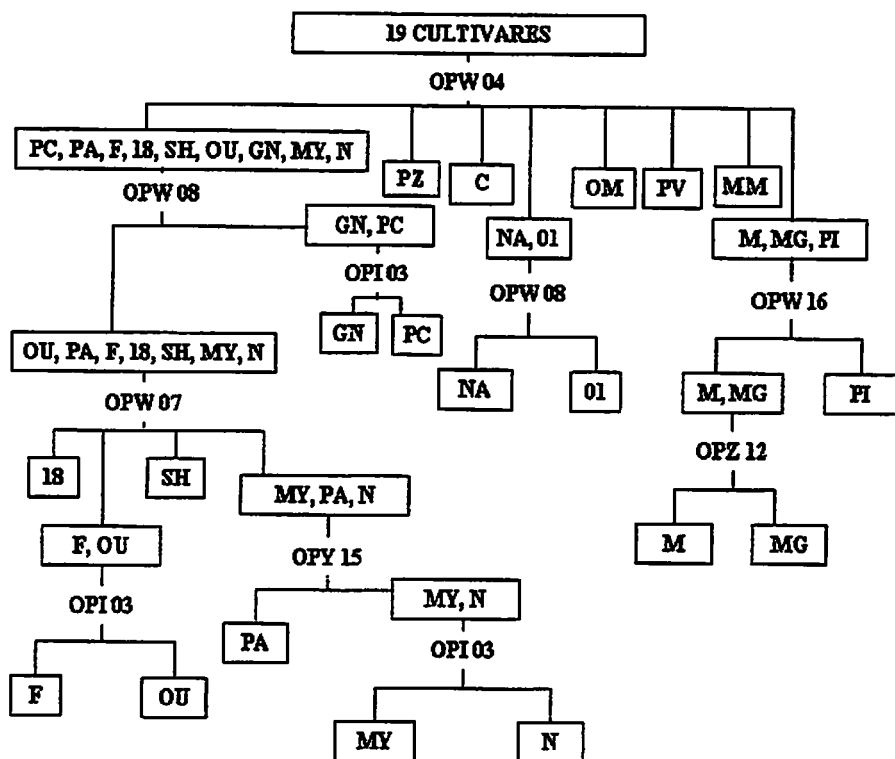


FIGURA 5. Fluxograma para diferenciação das 19 cultivares de bananeiras em estudo, utilizando marcadores RAPD. 01: FHIA-01; 18: FHIA-18; SH: SH 3640; PI: Pioneira; OM: Ouro da Mata; GN: Grand Naine; C: Caipira; N: Nam; NA: Nanicão; M: Maçã; MG: Maçã Grande; PA: Prata Anã; PC: Prata Comum; PV: Pacovan; MY: Mysore; F: Figo; PZ: Prata Zulu; OU: Ouro; MM: Marmelo. EMBRAPA Milho e Sorgo, Sete Lagoas - MG, 2002.

A amplificação com o primer OPW 04 gerou 8 padrões moleculares diferentes (Figura 6), permitindo a separação das 19 cultivares em 3 grupos distintos, além de identificar, padrões únicos para as cultivares Ouro da Mata (AAAB), Pacovan (AAB), Caipira (AAA), Prata Zulu (ABB) e Marmelo (AAB). No maior grupo formado pelo primer OPW 04 foram incluídas a maioria das cultivares AAB (Prata Anã, Prata Comum e Mysore), as tetraplóides (AAAB) SH-3640 e FHIA-18, as triplóides Nam (AAB), Figo (ABB) e Grand Naine (AAA) e a diplóide (AA) Ouro. No segundo grupo enquadraram-se as triplóides (AAB) Maçã e Maçã Grande e a tetraplóide (AAAB) Pioneira. Já um terceiro grupo foi formado com a cultivar Nanicão (AAA) e a FHIA-01 (AAAB), que em seguida foram separadas pelo primer OPW 08 (Figura 7).

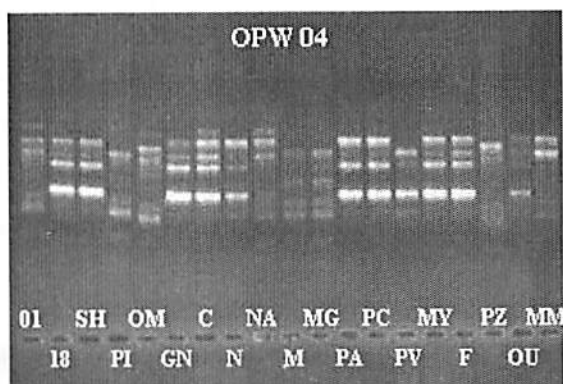


FIGURA 6. Padrões moleculares obtidos utilizando o primer OPW 04 via RAPD, em gel de agarose 1,0%. 01: FHIA-01; 18: FHIA-18; SH: SH 3640; PI: Pioneira; OM: Ouro da Mata; GN: Grand Naine; C: Caipira; N: Nam; NA: Nanicão; M: Maçã; MG: Maçã Grande; PA: Prata Anã; PC: Prata Comum; PV: Pacovan; MY: Mysore; F: Figo; PZ: Prata Zulu; OU: Ouro; MM: Marmelo. EMBRAPA Milho e Sorgo, Sete Lagoas - MG, 2002.

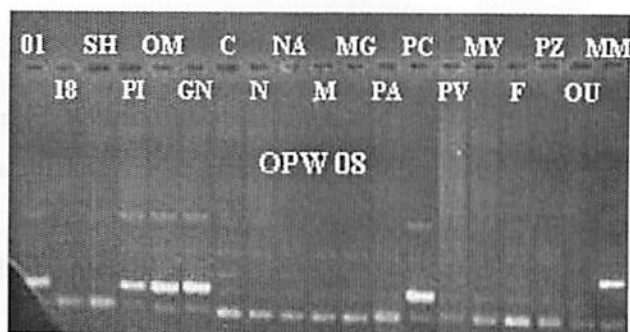


FIGURA 7. Padrões moleculares obtidos utilizando os primers OPW 08 via RAPD, em gel de agarose 1,0%. 01: FHIA-01; NA: Nanicão; 18: FHIA-18; SH: SH 3640; GN: Grand Naine; N: Nam; PA: Prata Anã; PC: Prata Comum; MY: Mysore; F: Figo; OU: Ouro. EMBRAPA Milho e Sorgo, Sete Lagoas - MG, 2002.

Os padrões moleculares obtidos através da aplicação do primer OPW 08 dentro do grupo formado pelas cultivares AAB (Prata Anã, Prata Comum e Mysore), (AAAB) SH-3640 e FHIA-18, Nam (AAB), Figo (ABB) e Grand Naine (AAA) e (AA) Ouro, permitiu a diferenciação das cultivares em dois grupos (Figura 7). Um agrupando as cultivares Ouro, Prata Anã, Figo, SH-3640, Mysore e Nam e outro contendo a Prata Comum e a Grand Naine, que foram posteriormente separadas com o do primer OPI 03 (Figura 8).



FIGURA 8. Padrões moleculares obtidos utilizando o primer OPI 03 via RAPD, em gel de agarose 1,0%. GN: Grand Naine; PC: Prata Comum; F:Figo; OU: Ouro; MY: Mysore e N: Nam. EMBRAPA Milho e Sorgo, Sete Lagoas - MG, 2002.

Ao grupo formado pela aplicação do primer OPW 08 (Prata Anã, Mysore, SH-3640 e FHIA-18, Nam, Figo e Ouro), foi aplicado o primer OPW 07 (Figura 9), que possibilitou a diferenciação das cultivares FHIA-18 e SH-3640 e a formação de mais dois grupos distintos, um englobando Figo e Ouro, diferenciadas com o primer OPI 03 (Figura 8) e um outro englobando Mysore, Prata Anã e Nam. Neste último grupo foi aplicado o primer OPY 15 (Figura 10), separando a Prata Anã das cultivares Mysore e Nam. Estas duas cultivares agrupadas pelo primer OPY 15 foram separadas utilizando-se o primer OPI 03 (Figura 8).

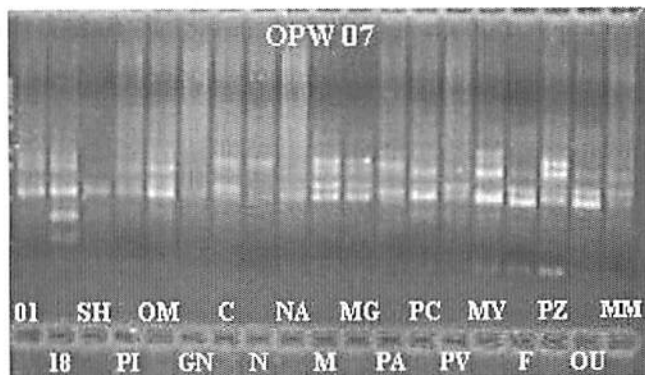


FIGURA 9. Padrões moleculares obtidos utilizando o primer OPW 07 via RAPD, em gel de agarose 1,0%. 18: FHIA-18; SH: SH 3640; N: Nam; PA: Prata Anã; MY: Mysore. EMBRAPA Milho e Sorgo, Sete Lagoas - MG, 2002.



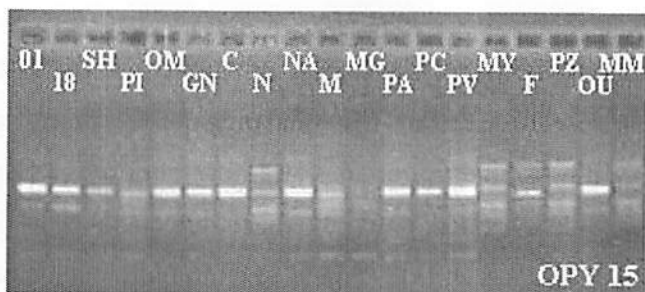


FIGURA 10. Padrões moleculares obtidos utilizando o primer OPY 15 via RAPD, em gel de agarose 1,0%. MY: Mysore; N: Nam e PA: Prata Anã. EMBRAPA Milho e Sorgo, Sete Lagoas - MG, 2002.

O último grupo gerado pela utilização do primer OPW 04 (Maçã, Maçã Grande e Pioneira) foi submetido ao primer OPW 16 que foi capaz de isolar a tetraplóide Pioneira das cultivares triplóides Maçã e Maçã Grande (Figura 11).

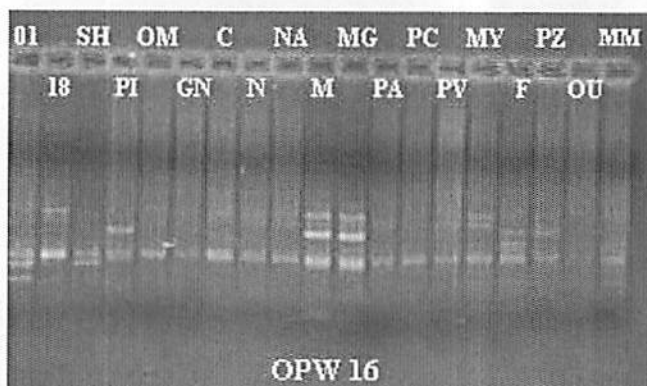


FIGURA 11. Padrões moleculares obtidos utilizando o primer OPW 16 via RAPD, em gel de agarose 1,0%. M: Maçã; MG: Maçã Grande e PI: Pioneira. EMBRAPA Milho e Sorgo, Sete Lagoas - MG, 2002.

Através do primer OPZ 12 (Figura 12) separou-se estas duas cultivares, finalizando o processo de diferenciação das 19 cultivares em estudo.

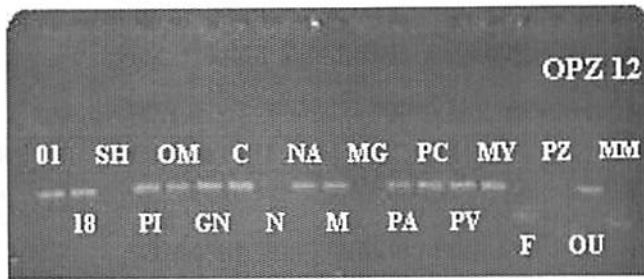


FIGURA 12. Padrões moleculares obtidos utilizando o primer OPZ 12 via RAPD, em gel de agarose 1,0%. M: Maçã e MG: Maçã. EMBRAPA Milho e Sorgo, Sete Lagoas - MG, 2002.

Optou-se pelo primer OPW 04 para dar início a diferenciação das 19 cultivares, pelo fato de ter gerado maior número de padrões moleculares distintos (8), apresentar o maior conteúdo de informatividade ( $PIC = 0,9628$ ) entre os utilizados e permitir a diferenciação de 124 combinações dois a dois entre as 171 possíveis de serem obtidas com as 19 cultivares estudadas (Tabela 6). Os primers OPI 03, OPW 08, OPW 07, OPW 16, OPY 15 e OPZ 12 conseguiram diferenciar 69, 53, 42, 34, 11 e 4 combinações dois a dois, respectivamente, além de apresentarem valores de PIC considerados elevados quando comparados a marcadores microssatélites utilizados em bananeiras por Tenkouano et al. (1998).

Podemos observar pela Tabela 6 que, outras possibilidades de fluxogramas para a diferenciação das 19 cultivares podem ser elaborados variando a ordem dos primers utilizados. No entanto, o fluxograma que utilizou a menor quantidade de primers diferentes para a diferenciação foi o apresentado na Figura 5.

TABELA 6. Tabela contendo todas os possíveis primers da “Operon Technologies” utilizados para diferenciar duas a duas, as 19 cultivares estudadas. EMBRAPA Milho e Sorgo, Sete Lagoas - MG, 2002.

<b>CULTIVARES</b>	<b>PRIMERS</b>	<b>CULTIVARES</b>	<b>PRIMERS</b>
01 X 18	W4, W7, W9, W16	18 X NA	W4, W7
01 X SH	W4, W7	18 X M	W4, Z17
01 X PI	W4, W7, W9, Z19	18 X MG	W4, W7, W16, Z19
01 X OM	W2, W9, W16	18 X PA	W7
01 X GN	W4, W8, W16	18 X PC	W7, W16
01 X C	E8, W8, W16	18 X PV	W4, W7, W9, Y15
01 X N	W4, W16	18 X MY	W3, W7, E18
01 X NA	W8, W16	18 X F	W7, W9, E18, Z19
01 X M	W4, W9, W16, Z12	18 X PZ	W3, W4, W9, Z19
01 X MG	W3, W4, W16, Y15	18 X OU	W7, W9, i3, Z19
01 X PA	W4, W7, W8	18 X MM	W3, W4, W8, i3
01 X PC	W4, W8, W9	SH X PI	W4, W7, Z19
01 X PV	W3, W4, W8, W9, W16	SH X OM	W4, W16, Z19
01 X MY	W4, W8, W16	SH X GN	W7, Z19
01 X F	W3, W4, W8, i3, Z19	SH X C	W7, W16, Z19
01 X PZ	W3, W8, W9, W16, Z19	SH X N	W7, i3, Z19
01 X OU	W4, W8, i3, Z15,	SH X NA	W4, W16, Z19
01 X MM	W3, W4, W7, i3, Z15	SH X M	W4, W16, Y3
18 X SH	W7, W16	SH X MG	W4, W7, W16
18 X PI	W4, W7, W16, Z19	SH X PA	W16
18 X OM	W4, W7	SH X PC	W4, W7, Z19
18 X GN	W7, W16, i3	SH X PV	W4, W16, Z19
18 X C	W4, W7, i3, E18	SH X MY	W4, W16, Z19
18 X N	W7, i3, Z19	SH X F	W7, W16, Y15
SH X PZ	W4, W7, W16, Z19, Z15	OM X OU	W4, W8, i3
SH X OU	W7; I3, Z19	OM X MM	W4, W8, i3
SH X MM	W4, W7, W8, Z19, Y15	GN X C	W4
PI X OM	W2, W4, W16, Z19	GN X N	Z12
PI X GN	W2, W4, W8, W16	GN X NA	W4
PI X C	W2, W4, W8, i3, Z19	GN X M	W2, W4, i3, Z17

...continua...

Tabela 6. Cont.

PI X N	W2, W4, W8, W16, Z19	GN X MG	W4, i3, Z19
PI X NA	W2, W4, W8, i3, Z19	GN X PA	W3
PI X M	W2, W8, W16	GN X PC	i3
PI X MG	W3, W7, W8, W16	GN X PV	W3, W4, i3
PI X PA	W2, W8, W16, Y15	GN X MY	W3, i3
PI X PC	W4, W8, W9, W15	GN X F	W3, Z12, i3
PI X PV	W4, W8, W9, W15	GN X PZ	W3, W4, i3
PI X MY	W4, W8, W9, W15	GN X OU	W8, W7, Z19
PI X F	W4, W8, W9	GN X MM	W3, W4, W8, i3
PI X PZ	W4, W8, W9	C X N	W4
PI X OU	W4, W8, W9	C X NA	W4
PI X MM	W4, W8, W9	C X M	W2, W3, W4, W7
OM X GN	W2, W4, W8, i3	C X MG	W3, W4, W16, i3
OM X C	W2, W4, W8, i3	C X PA	W4
OM X N	W4, W8, I3	C X PC	W4, I3
OM X NA	W2, W4, W8, I3	C X PV	W3, W4, I3
OM X M	W2, W4, W8	C X MY	W3, W4, W16, I3
OM X MG	W2, W4, W8	C X F	W3, W4, I3, Z19
OM X PA	W2, W4, W8	C X PZ	W4, W7, I3, Y3
OM X PC	W2, W4, W8	C X OU	W3, W4
OM X PV	W2, W4, W8	C X MM	W4, W7, W8, I3, Y3
OM X MY	W2, W4, W8	N X NA	W2, W3, W4
OM X F	W4, W8, I3	N X M	W3, W4, I3, Z17
OM X PZ	W3, W4, W8	N X MG	W3, W4, W7, I3
N X PA	W2, W3; Y 15	MG X MY	W3, W4, W9, Z19
N X PC	I3	MG X F	W4, W9, Z19
N X PV	W3, W4, I3	MG X PZ	W4, W9, Y15, Z19
N X MY	W3, i3	MG X OU	W3, W4, I3, Z19
N X F	W3, W7, I3, Z19	MG X MM	W3, W4, W8, I3
N X PZ	W3, W4, i3, E18	PA X PC	W8
N X OU	W7, W16	PA X PV	W4
N X MM	W3, W4, W8, I3	PA X MY	Y15
NA X M	W2, W4, W9, I3, Z19	PA X F	W7, Z19
NA X MG	W4, W9, I3	PA X PZ	W4, W7, Y15
NA X PA	W4	PA X OU	W7, Z19
NA X PC	W4, W8, W9, I3	PA X MM	W4, W7, W8, Z19
NA X PV	W4, W9, I3	PC X PV	W3, W4, W7

...continua...

**Tabela 6. Cont.**

NA X MY	W4, W9, I3	PC X MY	W3, W4
NA X F	W4, W9, I3, Z19	PC X F	W4, W9, I3, Z19
NA X PZ	W4, W9, i3, Z19, Y15	PC X PZ	W4, W9, Y15, Z19
NA X OU	W4, W9	PC X OU	W8, I3, Z19
NA X MM	W4, W9, I3, Z19, Y15	PC X MM	W4, W9, I3, Z19
M X MG	Z12, Z17	PV X MY	W3, W4, W7
M X PA	W2, W4	PV X F	W4, W9, I3, Z19
M X PC	W2, W4, W9	PV X PZ	W4, Y15, Z19
M X PV	W2, W4, W9	PV X OU	W3, W4, I3
M X MY	W2, W3, W4, W9	PV X MM	W4, W8, I3, Z19
M X F	W4, W9, I3	MY X F	W9, I3, Z12
M X PZ	W3, W4, W9	MY X PZ	W4, W9, Z19
M X OU	W3, W4, W9, I3	MY X OU	W7, W3, I3
M X MM	W3, W4, W8, I3	MY X MM	W4, W8, I3, Z19
MG X PV	W4, W9, Z19	F X MM	W3, W4, W8, i3
MG X PC	W4, W9, Z19	F X OU	W3, W9, I3, Z19
MG X PA	W4, Z19	F X PZ	W4, I3
PZ X OU	W7, W9, i3, E18	OU X MM	W4, W8, i3, Z19
PZ X MM	W3, W8, i3, Z15		

### **3.3 EXPERIMENTO III. Certificação genética de mudas micropropagadas de bananeiras utilizando marcadores RAPD: Estudo de Caso.**

#### **3.3.1 Estudo de Caso I. Confirmação de contaminação genética pela cultivar Prata Anã em um lote de meristemas isolados da cultivar Maçã.**

Utilizando o primer OPW 04 foi possível diferenciar as amostras enviadas e estabelecer a suas identidades genéticas (Figura 13).

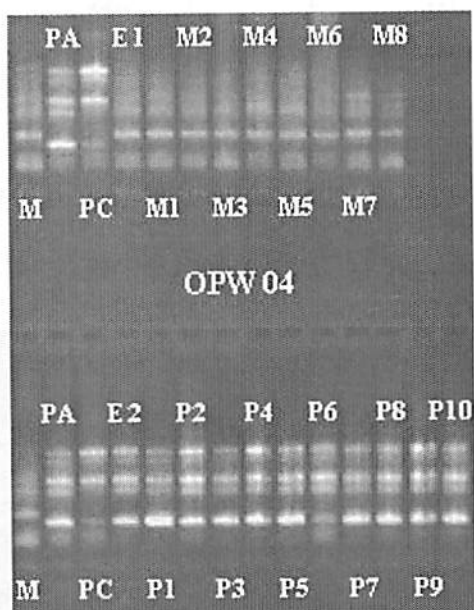


FIGURA 13. Padrão de amplificação de 18 amostras de bananeiras e dos controles utilizando o primer OPW 04, em gel de agarose 1,0%. M: Maçã (controle NBA); PA: Prata Anã (controle NBA); E1: Maçã (controle BIOCELL); E2: Prata Anã (controle BIOCELL); M1 a M8: Maçã; P1 a P10: Prata Anã. EMBRAPA Milho e Sorgo, Sete Lagoas - MG, 2002.

Pela comparação das amostras com os padrões moleculares obtidos, pode-se afirmar que as amostras M1, M2, M3, M4, M5, M6, M7 e M8 são mudas de bananeiras da cultivar Maçã e que as amostras P1, P2, P3, P4, P5, P6, P7, P8, P9 e P10 são representantes da cultivar Prata Anã. Podemos afirmar que, dentre as amostras analisadas não foram encontrados indivíduos Prata Comum.

Portanto, fica evidenciada a contaminação do lote de meristemas da cultivar Maçã, apenas por indivíduos da cultivar Prata Anã. No anexo 2a, encontra-se a forma de apresentação proposta para o Laudo de Certificação Genética de mudas de bananeiras.

### 3.3.2 Estudo de Caso II. Certificação da identidade genética de 40 amostras de folhas de bananeiras.

Através dos marcadores RAPD foi possível diferenciar os materiais enviados para análise em dois grupos distintos (“A” e “B”), utilizando o primer OPW 04 (Figura 14).

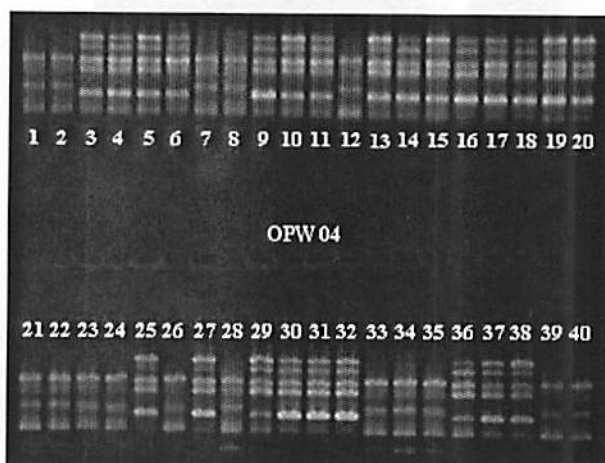


FIGURA 14. Produtos de amplificação dos DNAs das 40 amostras enviadas para análise, em gel de agarose 1%. EMBRAPA Milho e Sorgo, Sete Lagoas - MG, 2002.

As amostras enquadradas no grupo A (1, 2, 7, 8, 12, 21, 22, 23, 24, 26, 28, 33, 34, 35, 39 e 40) foram identificadas, por comparação com os padrões moleculares obtidos com o primer OPW 04 (Figura 15), como pertencentes a cultivar Maçã, uma vez que este primer gerou um padrão molecular diferenciado para esta cultivar.

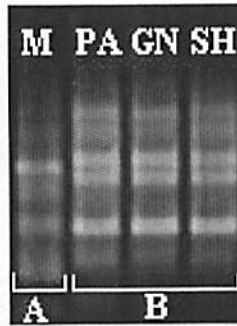


FIGURA 15. Padrões moleculares obtidos via RAPD utilizando o primer OPW 04, em gel de agarose 1,0%. M : Maçã; PA : Prata Anã; GN : Grand Naine e SH : SH-3640; A = grupo A e B = grupo B. EMBRAPA Milho e Sorgo, Sete Lagoas - MG, 2002.

No grupo B foram enquadradas as amostras 3, 4, 5, 6, 9, 10, 11, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 27, 29, 30, 31, 32, 36, 37 e 38. No entanto, o primer OPW 04 não foi capaz de diferenciar as cultivares Grand Naine, Prata Anã e SH - 3640 (Figura 15).

Utilizando o primer OPI 03 (Figura 16) foi possível identificar as amostras 30, 31 e 32 como pertencentes a cultivar Grand Naine dentro do grupo B. Apesar de trabalhar com cultivares diferentes das apreciadas neste estudo, Bhat et al. (1995) utilizando marcadores RAPD também obteve sucesso na diferenciação de cultivares triplóides AAA, como a Grand Naine, de cultivares que apresentam em seu genoma influência de *Musa balbisiana* (B) como são os casos da Prata Anã (AAB) e SH-3640 (AAAB).

O primer OPI 03 não foi capaz de diferenciar dentro do grupo B, as cultivares SH-3640 e Prata Anã (Figura 16).





FIGURA 16. Produtos de amplificação das amostras pertencentes ao grupo B, em gel de agarose 1%. 3 – 38 = amostras; GN: Grand Naine; M: Maçã; PA: Prata Anã; PC: Prata Comum e SH: SH-3640. EMBRAPA Milho e Sorgo, Sete Lagoas - MG, 2002.

A diferenciação entre as cultivares Prata Anã e SH-3640, dentro do grupo B, foi realizada utilizando-se o primer OPW 16. Como o auxílio deste primer foi possível afirmar que as amostras 16, 17 e 18 pertencem a cultivar SH-3640 (Figura 17). As amostras 3, 4, 5, 6, 9, 10, 11, 13, 14, 15, 19, 20, 25, 27, 29, 36, 37 e 38 foram agrupadas em um mesmo grupo, identificado através da comparação com os padrões moleculares como indivíduos da cultivar Prata Anã (Figura 17). Crouch et al. (1999), também conseguiu a diferenciação de cultivares triplóides AAB de tetraplóides AAAB, com a Prata Anã e SH-3640 respectivamente, utilizando o mesmo primer OPW 16.

SH		16	17	18			OPW	16										
PA	3	4	5	6	9	10	11	13	14	15	19	20	25	27	29	36	37	38

FIGURA 17. Produtos de amplificação das amostras pertencentes ao grupo B, em gel de agarose 1%. 3 – 38 = amostras; PA: Prata Anã e SH: SH-3640. EMBRAPA Milho e Sorgo, Sete Lagoas - MG, 2002.

## 4 CONCLUSÕES

- A avaliação da diversidade genética, por meio de marcadores RAPD é eficiente em agrupar as cultivares de acordo com os seus grupos genômicos;
- Marcadores RAPD podem ser utilizados em programas de certificação genética de matrizes e mudas micropropagadas de bananeira.

## 5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, E. J. **A cultura da banana: aspectos técnicos, socioeconômicos e agroindustriais**. 2.ed. Brasília: EMBRAPA – SPI / Cruz das Almas: EMBRAPA – CNPMF, 1999. 585p.

ALVES, E.J. Caracterização e avaliação de germoplasma de banana (*Musa spp*). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 7., 1984, Florianópolis. **Anais...** Florianópolis, SC: SBF / EMPASC, 1984. v. 1, p. 203 – 212.

BHAT, K. A.; BHAT, S. R.; CHANDEL, K. P. S.; LAKHANPAUL, S.; ALI, S. DNA fingerprinting of *Musa* cultivars with oligodeoxyribonucleotide probes specific for simple repeat motifs. **Genetic Analysis: Biomolecular Engineering**, v. 12, p. 45 – 51, 1995.

BHAT, K. A.; JARRET, R. L. Random amplified polymorphic DNA and genetic diversity In Indian *Musa* germoplasm. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 42, p. 107 – 118, 1995.

CROUCH, J. H.; CROUCH, H. K.; TENKOUANO, A.; ORTIZ, R. VNTR – based diversity analysis of 2X and 4X full – sib *Musa* hybrids. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 2, n.3, 1999.

EFRON, B. **The bootstrap, the jackknife, and other resampling plants**. Philadelphia: Society of Indian Applied Mathematics, 1981. 138 p.

LEBOT, V., ARADHYA, K. M. Genetic relationships among cultivated bananas and plantains from Asia and the Pacific. **Euphytica**, v. 67, p. 163 – 176, 1993.

PAZ, O. P. da. **Caracterização de germoplasma de bananeira com RAPD.** Cruz das Almas, BA: UFBA, 2000. 69 p. (Dissertação de Mestrado em Agronomia).

PILLARY, M.; OGUNDIWIN, E.; NWAKANMA, D. C.; UDE, G.; TENKOUANO, A. Analysis of genetic diversity and relationships in East African banana germoplasm. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 102, n. 6 / 7, p. 956 – 970, 2001.

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

TENKOUANO, A.; CROUCH, J. H.; CROUCH, H. K.; ORTIZ, R. Genetic diversity hybrid performance, and combining ability for yield in Musa germoplasm. **Euphytica**, v. 102, p. 281 – 288, 1998.

TENKOUANO, A.; CROUCH, J. H.; CROUCH, H. K.; ORTIZ, R. Comparison of DNA marker and pedigree – based methods of genetic analysis of plantain and banana clones. I. Estimation of genetic relationships. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 98, p. 98 – 68, 1999.

## **CAPÍTULO II: CERTIFICAÇÃO FITOSSANITÁRIA DE MATRIZES DE BANANEIRA ATRAVÉS DE RT-PCR, DOT-BLOT E ELISA**

### **RESUMO**

Gomes, G. A. C. **Certificação fitossanitária de matrizes de bananeira através de RT-PCR, DOT-BLOT e ELISA.** Lavras: UFLA, 2002. 127 p. (Tese de Doutorado em Agronomia).

Este estudo visou comparar a eficiência, sensibilidade dos testes RT-PCR (Reverse Transcriptase – Polymerase Chain Reaction), Hibridação molecular com sonda marcada a frio (Dot-Blot) e ELISA, bem como verificar a influência do local amostragem na folha e a melhor forma de armazenamento das amostras para a detecção do vírus do mosaico das cucurbitáceas (CMV) em programas de certificação fitossanitária de matrizes de bananeiras. Para a realização do teste ELISA foi adquirido o “Kit Direct ELISA CMV” da Agdia Company. Através da hibridação com uma sonda marcada com digoxigenina complementar a dois terços do gene da capa protéica do CMV foram realizados os testes Dot-Blot. Para a realização do teste RT-PCR foi necessário estabelecer metodologias para a extração de RNA total, transformação do RNA em cDNA e para a amplificação de um fragmento de 745pb através da utilização de primers específicos para a capa protéica do CMV. Nossos resultados mostraram que, as amostras que serão submetidas ao teste RT-PCR necessitam ser imediatamente armazenadas em nitrogênio líquido depois de retiradas da planta doadora. Para os testes Dot-Blot e ELISA, as amostras podem ser armazenadas em saco plástico contendo jornal úmido por até 10 dias. O local de coleta na folha não interfere nos resultados dos testes. Foi possível detectar a presença do CMV em extratos foliares ou RNAs armazenados por 4 meses a  $-80^{\circ}\text{C}$ . O testes RT-PCR, Dot-Blot e ELISA são suficientemente sensíveis para detectar a presença do plasmídeo clonado com o fragmento de cDNA correspondente a dois terços do gene da capa protéica do CMV em concentrações de até  $10\text{ fg}/\mu\text{L}$ ,  $100\text{ pg}/\mu\text{L}$  e  $100\text{ ng}/\mu\text{L}$ , respectivamente.

---

Comitê Orientador: Renato Paiva-UFLA (Orientador), Edilson Paiva-EMBRAPA Milho e Sorgo, Elizabeth de Oliveira-EMBRAPA Milho e Sorgo e Newton Portilho Carneiro-EMBRAPA Milho e Sorgo.

O teste RT-PCR apresentou-se 1.000 vezes mais eficiente do que o teste Dot-Blot e 100.000 vezes mais do que o ELISA. Recomenda-se a aplicação do teste RT-PCR apenas nas matrizes doadoras de meristemas devido ao seu alto custo e alta complexidade.

## ABSTRACT

Gomes, G. A. C. **Phytopatologic certification of donor banana plants by RT-PCR, Dot-Blot and ELISA.** Lavras: UFLA, 2002. 127p. (Doctorate Thesis in Agronomy).

Comparisons among three methods of CMV diagnosis were performed with the objective to verify the possibility use in programs of phytopatogenic certification of banana plantlets. For the ELISA Test it was used a "Kit Direct ELISA CMV" from Agdia Company. By hibridizing a probe labeled with digoxigenin that overlap two third of CMV proteic coat gene, a Dot-Blot test was used. For the RT-PCR it was necessary to optimize methodologies for total RNA extraction, RNA transformation in cDNA and for 745 bp fragment amplification was used a set of primers specific for CMV proteic coat. Our results showed that samples submitted to RT-PCR test need to be stored immediately in liquid nitrogen after mother plant. For Dot-Blot and ELISA tests, the samples were stored of plastic bag containing wet paper 10 days. Leaf plant position did not interfer in the test results. It was possible to detect CMV presence in leaf extracts or RNAs stored for 4 months at  $-80^{\circ}\text{C}$ . The RT-PCR test, Dot-Blot and ELISA are sensible enough to detect the cloned plasmid presence with the cDNA fragment correspondent to two third of CMV proteic coat gene in concentratios  $10\text{ fg}/\mu\text{L}$ ,  $100\text{ pg}/\mu\text{L}$  and  $100\text{ ng}/\mu\text{L}$ , respectively. The RT-PCR test presented to be 1000 fold more efficient than Dot-Blot and 100.000 fold than ELISA. It is recommended the RT-PCR test only in meristem donor plants due the high cost and complexity.

---

Guidance Committee: Renato Paiva-UFLA (Major Professor), Edilson Paiva-EMBRAPA Milho e Sorgo, Elizabeth de Oliveira-EMBRAPA Milho e Sorgo and Newton Portilho Carneiro-EMBRAPA Milho e Sorgo.

## 1 INTRODUÇÃO

Apesar da evolução das técnicas de propagação da bananeira, muitos plantios comerciais dessa frutífera são comprometidos pela utilização de mudas infectadas por inúmeras doenças.

O Instituto Mineiro de Agropecuária obriga aos produtores de mudas que seus viveiros estejam isentos de nematóides (*Radopholus similis*, *Helicotylenchus multincinetus* e *Meloidogyne sp*), fungos causadores do Mal-do-Panamá (*Fusarium oxisporum* pv. *Cubense*); bactérias causadoras da Murcha Bacteriana (*Pseudomonas solanacearum*) e Erwinia (*Erwinia musea*) e do Vírus do Mosaico das Cucurbitáceas (CMV). Periodicamente, são realizadas inspeções nos viveiros para assegurar a qualidade das mudas. Além disso, são exigidos certificados que comprovem a sanidade das mudas a serem comercializadas

A indexação das mudas para a verificação da presença de vírus, principalmente do CMV, é realizada mediante aplicação do teste ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay).

Com o surgimento das técnicas moleculares de detecção, novas alternativas mais sensíveis e precisas estão a disposição para serem utilizadas na detecção de vírus em plantas.

Portanto, este estudo visou comparar a eficiência, sensibilidade dos testes RT-PCR (Reverse Transcriptase - Polymerase Chain Reaction), hibridação molecular com sonda marcada a frio (Dot-Blot) e ELISA, bem como verificar a influência do local amostragem na folha e a melhor forma de armazenamento das amostras para a detecção do vírus do mosaico das cucurbitáceas (CMV) em programas de certificação fitossanitária de matrizes de bananeiras.



## 2 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Biologia Molecular do Núcleo de Biologia Aplicada (NBA) da EMBRAPA Milho e Sorgo localizada em Sete Lagoas, MG.

O RNA total foi extraído de amostras de folhas de bananeiras infectadas pelo vírus CMV, cultivadas no campo experimental do Núcleo de Biologia Aplicada da EMBRAPA Milho e Sorgo. A presença do vírus nessas amostras foi previamente confirmada pelo teste ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay).

### 2.1 Teste RT – PCR (Reverse Transcriptase – Polymerase Chain Reaction)

A extração do RNA total foi realizada adicionando-se, em microtubo de 2 mL autoclavado, 0,2 g de tecido foliar fresco moído na presença de N<sub>2</sub> líquido, 500 µL de tampão de extração (100mM TRIS HCl pH 7,5; 20mM EDTA; 0,1% SDS; 1M NaCl; 1% β – Mercaptoetanol), 500 µL de fenol saturado e 0,1g de PVPP. Em seguida, o microtubo foi levado ao vortex por 15 minutos. Adicionou-se ao final da homogeneização 500µL de clorofórmio e repetiu-se a homogeneização em vortex por 1 minuto. A mistura foi centrifugada a 14000 rpm por 5 minutos. Após este período, o sobrenadante foi transferido para outro tubo contendo 300 µL de clorofórmio. Procedeu-se breve homogeneização em vortex e novamente a mistura foi submetida a centrifugação por 5 minutos a 14000 rpm. O sobrenadante foi coletado e a ele foi adicionado 1 volume de isopropanol. Após suave homogeneização o tubo foi mantido no gelo por 10 minutos. Em seguida, a solução foi centrifugada a 14000 rpm por 5 minutos. Descartou-se o sobrenadante e o pellet obtido foi ressuspensão em 50 µL de H<sub>2</sub>O – DEPC.

A integridade do RNA total extraído foi verificada em gel de agarose 0,8% contendo 0,2 µg/mL de brometo de etídio. A imagem fotográfica do perfil eletroforético foi realizada pelo sistema de documentação de gel “Eagle Eye” (Stratagene, La Jolla, CA, USA).

Após a verificação da integridade do RNA total, este foi imediatamente utilizado para a síntese do cDNA.

Os primers MPTV-1 (5' CAT CGA CCA TGG ACA AAT CTG AAT CAA C 3') e MPTV - 2 (5' CTC TCC ATG GCG TTT AGT GAC TTC AGC AG 3') utilizados para a transcrição reversa, foram sintetizados pela Universidade Federal do Paraná conforme o protocolo descrito por Hu (1995).

Para a transcrição reversa do RNA foi preparada uma reação contendo 1,6 µL RNA (5 ng/µL), 9,4 µL água - DEPC e 1 µL do primer MPTV - 2 (0,134 µmoles/mL). Após incubação por 10 minutos a 70°C, foram adicionados à solução 2 µL DTT (0,1 M), 4µL de Tampão 5 X e 1 µL dNTPs (2,5 mM). Esta solução permaneceu incubada por 2 minutos a 42°C. Ao final deste período, foi adicionado à solução 1 µL da enzima transcriptase reverse (Super Script II RT, Gibco BRL), e em seguida, a solução foi incubada a 42°C por 90 minutos. Visando paralisar a reação, a solução foi mantida a 70°C por 15 minutos. Logo após, foi adicionado à solução 2µL de NaOH (25mM) e a solução permaneceu incubada por 30 minutos a 68°C.

A amplificação do fragmento de cDNA foi realizada numa reação contendo 2 µL do cDNA, 11,05 µL água, 2 µL tampão PCR 10 X, 1,9 µL dNTPs (2,5mM), 1 µL primer MPTV-1 (0,134µmoles/mL), 1 µL primer MPTV-2 (0,134 µmoles/mL), 0,25 µL da enzima Taq polimerase (GIBCO BRL) e 0,8 µL MgCl<sub>2</sub>.

A reação de PCR foi constituída por uma desnaturação inicial a 95°C por 1 minuto, seguida de 35 ciclos a 95°C por 10 segundos, 55°C por 10 segundos, 72°C por 30 segundos e uma extensão final a 72°C por 2 minutos. Após a

amplificação, os produtos amplificados foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,0 % utilizando-se tampão de corrida TAE (1mM EDTA, pH 8,0; 40 mM Tris, pH 8,0; 20mM ácido acético).

As amostras foram consideradas positivas para a presença do vírus quando foi observada uma banda de, aproximadamente, 745 pares de base no gel de agarose (Hu et al., 1995).

Como controles positivos e negativos, foram utilizadas amostras de folhas provenientes de plantas infectadas e sadias, cultivadas no campo experimental o Núcleo de Biologia Aplicada (NBA) da EMBRAPA Milho e Sorgo.

## 2.2 Teste via Hibridação Molecular (Dot-Blot)

Para a realização deste teste fez-se necessário a obtenção de uma sonda marcada a frio específica para o CMV.

Para a obtenção da sonda foram utilizados os fragmentos amplificados via RT-PCR e purificados do gel de agarose utilizando-se o “Kit” QIAquick gel Extraction. Em seguida, os fragmentos foram clonados no vetor pCR II, utilizando-se o “Kit” TA Cloning (Invitrogen, San Diego, CA, USA), de acordo com as recomendações do fabricante. O método de clonagem constituiu na ligação dos fragmentos com o vetor que possui dois sítios de restrições para *Eco* RI, pela enzima DNA ligase do fago T<sub>4</sub>, originando plasmídeos recombinantes, que foram transformados em *E. coli*. Os plasmídeos recombinantes foram purificados pelo método da lise alcalina. Digestões com a enzima *Eco* RI foram realizadas, a fim de verificar a presença do fragmento de interesse. Todas as digestões foram realizadas a 37 °C por 2 horas. Os resultados foram analisados por meio de eletroforese em gel de agarose 0,8% e a captura fotográfica foi realizada pelo sistema de documentação de gel “Eagle Eye” (Stratagene, La Jolla, CA, USA).

Os plasmídeos recombinantes foram seqüenciados pelo método de dideoxirribonucleotídeos terminadores (Sanger et al., 1977), utilizando-se o "Kit" sequenase (USB, Cleveland, OH) e os oligonucleotídeos M13 e T7. As seqüências de nucleotídeos foram comparadas entre si e com seqüências de outros isolados pertencentes a ambos os subgrupos do CMV, previamente publicadas, utilizando-se o programa GCG da Universidade de Wisconsin, EUA.

A marcação a frio da sonda foi realizada através de uma reação contendo 9,2  $\mu\text{L}$  água, 5  $\mu\text{L}$  tampão PCR 10X, 1,5  $\mu\text{L}$   $\text{MgCl}_2$  (50 mM), 2  $\mu\text{L}$  dNTPs (2,5 mM), 1  $\mu\text{L}$  Taq (5 u/ $\mu\text{L}$ ), 5  $\mu\text{L}$  primer M13 (2 $\mu\text{M}$ ), 5  $\mu\text{L}$  primer Reverse (2 $\mu\text{M}$ ), 1  $\mu\text{L}$  plasmídeo diluído (1/100) e 0,5  $\mu\text{L}$  de digoxigenina (1mM) sob as seguintes condições de reação: 30 ciclos a 95 °C por 15 segundos, 55 °C por 30 segundos e 72 °C por 30 segundos. Para verificação da marcação foram aplicados 2  $\mu\text{L}$  da sonda em gel de agarose 1,2%.

Após a obtenção da sonda CMV, o teste de hibridação molecular foi realizado macerando-se aproximadamente 5 mg de folha de bananeira em  $\text{N}_2$  líquido. Em seguida, transferiu-se o macerado para um tubo eppendorf e adicionou-se 500 $\mu\text{L}$  de tampão de extração (100mM TRIS HCl pH 7,5; 10 mM EDTA pH 8,0; 0,1% SDS; 1mM NaCl e 1%  $\beta$ -Mercaptoetanol) e 0,1 grama de PVPP. Após breve agitação, a solução foi incubada em banho maria a 100 °C durante 5 minutos. Ao término da incubação, o tubo foi imediatamente colocado no gelo até esfriar. Seguiu-se então, uma centrifugação por 5 minutos a 14000 rpm, da qual foi coletado o sobrenadante. Visando eliminar impurezas foi realizada uma clarificação do sobrenadante adicionando-se 600  $\mu\text{L}$  de etanol gelado. Em seguida, foi realizada uma nova centrifugação por 5 minutos a 14000 rpm e descarte do sobrenadante, obtendo-se um pellet.

Após resssusponder o pellet em 200  $\mu\text{L}$  TE pH 8,0 (Tris 0,01 M, pH 8,0; EDTA 0,001 M, pH 8,0), pipetou-se 2  $\mu\text{L}$  do sobrenadante em uma membrana de nylon, que em seguida foi fixada por 30 segundos no ultra violeta. Depois de

fixada, a membrana foi pré-hibridizada por 2 horas em HYB (5X SSC; 0,1% Blocking Reagent; 0,1% laurilsarcosine e 0,1% SDS) a 65 °C. Passado este período, adicionou-se HYB contendo 80 ng / mL de sonda previamente desnaturada (2µL da sonda em 200 µL de HYB a 100°C por 10 minutos). Em seguida, a membrana permaneceu hibridizando a 65 °C por 18 horas. Posteriormente, procederam-se 2 lavagens da membrana, de 5 minutos cada, com uma solução contendo 0,15X SSC + 0,1% SDS, sob agitação a 27 °C. Em seguida, utilizando-se esta mesma solução foram realizadas 2 lavagens de 10 minutos cada a 65 °C, sob agitação. Após a segunda lavagem foi executada outra lavagem em tampão 1 (0,01M TRIS pH 7,5 e 0,15M NaCl) por 05 minutos a 27 °C, sob agitação.

Após as lavagens, a membrana foi incubada em tampão 2 (0,01M TRIS pH 7,5, 0,15M NaCl e 0,1% Blocking Reagent) por 20 minutos a 27 °C, (2mL / cm<sup>2</sup>), sob agitação. Em seguida, a membrana foi incubada em solução de ANTI-DIG (1µL ANTI-DIG em 15 mL tampão 2), por 1 hora a 27 °C, sob agitação. Após a incubação a membrana foi novamente lavada por 2 vezes, 10 minutos cada em tampão 1 a 27 °C e 1 vez com tampão 3 (0,01M TRIS pH 7,5, 0,10M NaCl e 0,05M MgCl<sub>2</sub>) a 27 °C por 5 minutos.

Em seguida, a membrana foi umedecida em solução contendo AMPPD (10µL AMPPD / mL tampão 3) entre 2 lâminas plásticas. A membrana envolvida pelas lâminas plásticas foi colocada em contato com filme de RAIÓ X, em câmara escura, por 3 horas a 37 °C. O filme foi revelado com GBX revelador e fixado com GBX fixador.

Foram consideradas positivas para a presença do vírus, as amostras que sensibilizaram o filme originando manchas circulares.

Como controles positivos e negativos, foram utilizadas amostras de folhas provenientes de plantas infectadas e sadias, cultivadas no campo

experimental do Núcleo de Biologia Aplicada (NBA) da EMBRAPA Milho e Sorgo.

### **2.3 Teste ELISA (“Enzyme Linked Immunosorbent Assay”)**

Para a realização deste teste foi adquirido o “Kit DIRECT ELISA CMV” da AGDIA Company.

A preparação da placa para a realização do teste foi feita pipetando-se 100 µL do anticorpo por célula da placa, que permaneceu incubada por 4 horas a 37 °C. Em seguida, a placa foi lavada por 4 vezes com PBST 1X. Após as lavagens, foram adicionados 100 µL da amostra preparada (1g folha : 10mL de tampão) por célula e procedeu-se nova incubação por 2 horas a 37 °C. Foram realizadas 4 lavagens com PBST 1X e em seguida foram adicionados 100µL da Ig G conjugada com fosfatase alcalina e incubou-se a placa por 2 horas a 37 °C. Novamente, a placa foi lavada com PBST 1X por 4 vezes e seca com papel toalha. Adicionou-se 100 µL da solução PNP e incubou-se a placa em estufa a 37 °C. Após 1 hora de incubação, a reação foi paralisada adicionando-se 50 µL de hidróxido de sódio 3M.

Todas as amostras foram repetidas em três placas diferentes para a obtenção de um valor médio para cada amostra.

Como controles positivos e negativos, foram utilizados os controles do próprio Kit CMV.

As leituras das placas foram realizadas a 405 nm em espectrofotômetro para placa ELISA Labsystems Multiskan MS. As amostras foram consideradas positivas quando o valor médio das três repetições por amostra foi superior ao valor de referência. O valor de referência foi determinado, multiplicando-se por 2 o valor médio dos três controles negativos.

## 2.4 EXPERIMENTO I. Comparação da sensibilidade e eficiência dos três testes de detecção para o CMV.

Para estimar a sensibilidade de cada teste foi utilizada uma solução contendo plasmídeos pCR II clonados com fragmentos de cDNA correspondentes a dois terços do gene da capa protéica do CMV. A concentração de plasmídeos em solução foi determinada em espectrofotômetro a 260 / 280 nm.

Baseado na concentração inicial dos plasmídeos (8,7  $\mu\text{g} / \mu\text{L}$ ), diluições em série foram preparadas, variando de 1  $\mu\text{g} / \mu\text{L}$  até 1 pg /  $\mu\text{L}$ . Em seguida estas diluições foram submetidas aos três testes para detecção do CMV.

A estimativa da eficiência de cada teste foi realizada utilizando-se amostras de folhas coletadas em três plantas da cultivar Grand Naine, cultivadas no campo experimental do Núcleo de Biologia Aplicada (NBA) da EMBRAPA Milho e Sorgo. A planta A apresentava folhas totalmente tomadas por fortes sintomas de mosaico, a planta B com sintoma menos intenso e a planta C com sintoma de mosaico suave (Figura 18).



FIGURA 18. Aspecto visual das plantas A (sintomas severos), B (sintomas moderados) e C (sintomas fracos). EMBRAPA Milho e Sorgo, Sete Lagoas - MG, 2002.

Para determinar a eficiência dos três testes foram utilizadas as seguintes diluições: 0X (extrato bruto ou 500 ng /  $\mu$ L de RNA); 1X; 10X; 100X; 1.000X; 10.000X; 100.000X; 1.000.000X e 10.000.000X.

Para os testes Dot-Blot e ELISA, os macerados de folhas foram diluídos em seus respectivos tampões de extração. No teste RT-PCR as diluições foram realizadas nos RNAs previamente diluídos para a concentração de 500 ng /  $\mu$ L. A determinação das concentrações iniciais dos RNAs foi realizada em espectrofotômetro a 260 / 280 nm.

**2.5 EXPERIMENTO II. Análise de 52 amostras de folhas de bananeira através dos três testes de detecção do CMV e padronização do local de amostragem na folha e das condições de armazenamento dos materiais vegetais coletados para análise.**

Na fazenda de propriedade do “Sr. Toninho”, localizada no município de Andradas – MG, foram coletadas 52 amostras de folhas de bananeira (Tabela 7). Imediatamente depois de coletadas, as amostras foram identificadas e armazenadas em nitrogênio líquido para serem transportadas até o laboratório de Biologia Molecular do Núcleo de Biologia Aplicada da EMBRAPA Milho e Sorgo, onde procedeu-se a realização dos três testes em todas as amostras. Nos testes RT-PCR e Dot-Blot, foram utilizados como controle positivo e negativo amostras coletadas de plantas infectadas e sadias cultivadas no campo experimental do Núcleo de Biologia Aplicada. Para o teste ELISA foram utilizados os próprios controles positivo e negativo do Kit.

Foram coletadas amostras de folhas de três moitas (planta adulta + filha) infectadas (Figura 19), de três moitas sadias e de uma planta infectada A (Figura 20). Na Figura 21 está representado o esquema de coleta das amostras das moitas infectadas e sadias.



A escolha das folhas a serem amostradas seguiu os padrões normalmente utilizados em estudos de detecção de fitopatógenos. Em plantas com sintomas típicos de mosaico, foram coletadas amostras das folhas que apresentavam sintomas e em plantas sem sintomas, coletaram-se amostras do terceiro par de folhas a partir do ápice.

Visando verificar a influência do local de amostragem na folha, os limbos foliares de uma folha sintomática e de uma folha sem sintoma da planta A foram subdivididas em 6 seções e as nervuras principais em três regiões, conforme detalhado na Figura 22 (amostras 35 a 52 da Tabela 7). Além das duas folhas que foram subdivididas, foi coletado o outro par de folhas da planta A, sendo que uma apresentando sinais de infecção e outra não (amostras 31 a 34 da Tabela 7).

**TABELA 7.** Identificação e caracterização das 52 amostras de folhas de bananeiras coletadas no município de Andradas - MG. EMBRAPA Milho e Sorgo, Sete Lagoas - MG, 2002.

<b>IDENTIFICAÇÃO</b>	<b>CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA</b>
1	MD1, PL. ADULTA. FOLHA C/ SINTOMA - LIMBO
2	MD1, PL. ADULTA. FOLHA C/ SINTOMA - NERVURA
3	MD1, PL. ADULTA C/ SINTOMA. FOLHA S/ SINTOMA - LIMBO
4	MD1, PL. ADULTA C/ SINTOMA. FOLHA S/ SINTOMA - NERVURA
5	MD1, FILHA S/ SINTOMA. FOLHA - LIMBO
6	MD1, FILHA S/ SINTOMA. FOLHA - NERVURA
7	MD2, PL. ADULTA. FOLHA C/ SINTOMA - LIMBO
8	MD2, PL. ADULTA. FOLHA C/ SINTOMA - NERVURA
9	MD2, PL. ADULTA. FOLHA S/ SINTOMA - LIMBO
10	MD2, PL. ADULTA. FOLHA S/ SINTOMA - NERVURA
11	MD2, FILHA S/ SINTOMA. FOLHA - LIMBO
12	MD2, FILHA S/ SINTOMA. FOLHA - NERVURA
13	MD3, PL. ADULTA. FOLHA C/ SINTOMA - LIMBO
14	MD3, PL. ADULTA. FOLHA C/ SINTOMA - NERVURA
15	MD3, PL. ADULTA. FOLHA S/ SINTOMA - LIMBO
16	MD3, PL. ADULTA. FOLHA S/ SINTOMA - NERVURA

...continua...

**Tabela 7. cont.**

---

17	MD3, FILHA S/ SINTOMA. FOLHA – LIMBO
18	MD3, FILHA S/ SINTOMA. FOLHA – NERVURA
19	MS1, PL. ADULTA. – LIMBO
20	MS1, PL. ADULTA– NERVURA
21	MS1, FILHA – LIMBO
22	MS1, FILHA - NERVURA
23	MS2, PL. ADULTA. – LIMBO
24	MS2, PL. ADULTA – NERVURA
25	MS2, FILHA – LIMBO
26	MS2, FILHA - NERVURA
27	MS3, PL. ADULTA. – LIMBO
28	MS3, PL. ADULTA – NERVURA
29	MS3, FILHA – LIMBO
30	MS3, FILHA - NERVURA
31	PL. A, FOLHA 1 C/ SINTOMA – LIMBO
32	PL. A, FOLHA 1 C/ SINTOMA – NERVURA
33	PL. A, FOLHA 2 S/ SINTOMA – LIMBO
34	PL. A, FOLHA 2 S/ SINTOMA – NERVURA
35	PL. A, FOLHA 3 C/ SINTOMA – LIMBO ESQUERDO SUPERIOR
36	PL. A, FOLHA 3 C/ SINTOMA – LIMBO ESQUERDO MÉDIO
37	PL. A, FOLHA 3 C/ SINTOMA – LIMBO ESQUERDO INFERIOR
38	PL. A, FOLHA 3 C/ SINTOMA – LIMBO DIREITO SUPERIOR
39	PL. A, FOLHA 3 C/ SINTOMA – LIMBO DIREITO MÉDIO
40	PL. A, FOLHA 3 C/ SINTOMA – LIMBO DIREITO INFERIOR
41	PL. A, FOLHA 3 C/ SINTOMA – NERVURA REGIÃO SUPERIOR
42	PL. A, FOLHA 3 C/ SINTOMA – NERVURA REGIÃO MEDIANA
43	PL. A, FOLHA 3 C/ SINTOMA – NERVURA REGIÃO INFERIOR
44	PL. A, FOLHA 4 S/ SINTOMA – LIMBO ESQUERDO SUPERIOR
45	PL. A, FOLHA 4 S/ SINTOMA. – LIMBO ESQUERDO MÉDIO
46	PL. A, FOLHA 4 S/ SINTOMA. – LIMBO ESQUERDO INFERIOR
47	PL. A, FOLHA 4 S/ SINTOMA – LIMBO DIREITO SUPERIOR
48	PL. A, FOLHA 4 S/ SINTOMA – LIMBO DIREITO MÉDIO
49	PL. A, FOLHA 4 S/ SINTOMA – LIMBO DIREITO INFERIOR
50	PL. A, FOLHA 4 S/ SINTOMA – NERVURA REGIÃO SUPERIOR
51	PL. A, FOLHA 4 S/ SINTOMA – NERVURA REGIÃO MEDIANA
52	PL. A, FOLHA 4 S/ SINTOMA – NERVURA REGIÃO INFERIOR

---

**MD: MOITA INFECTADA; MS: MOITA SADIA.**



FIGURA 19. Aspecto visual das moitas infectadas MD 1 (sintomas severos), MD 2 (sintomas moderados) e MD 3 (sintomas fracos). EMBRAPA Milho e Sorgo, Sete Lagoas - MG, 2002.



FIGURA 20. Aspecto visual da planta A (folha 1: com sintoma, folha 2: sem sintoma; folha 3: com sintoma; folha 4: sem sintoma). EMBRAPA Milho e Sorgo, Sete Lagoas - MG, 2002.

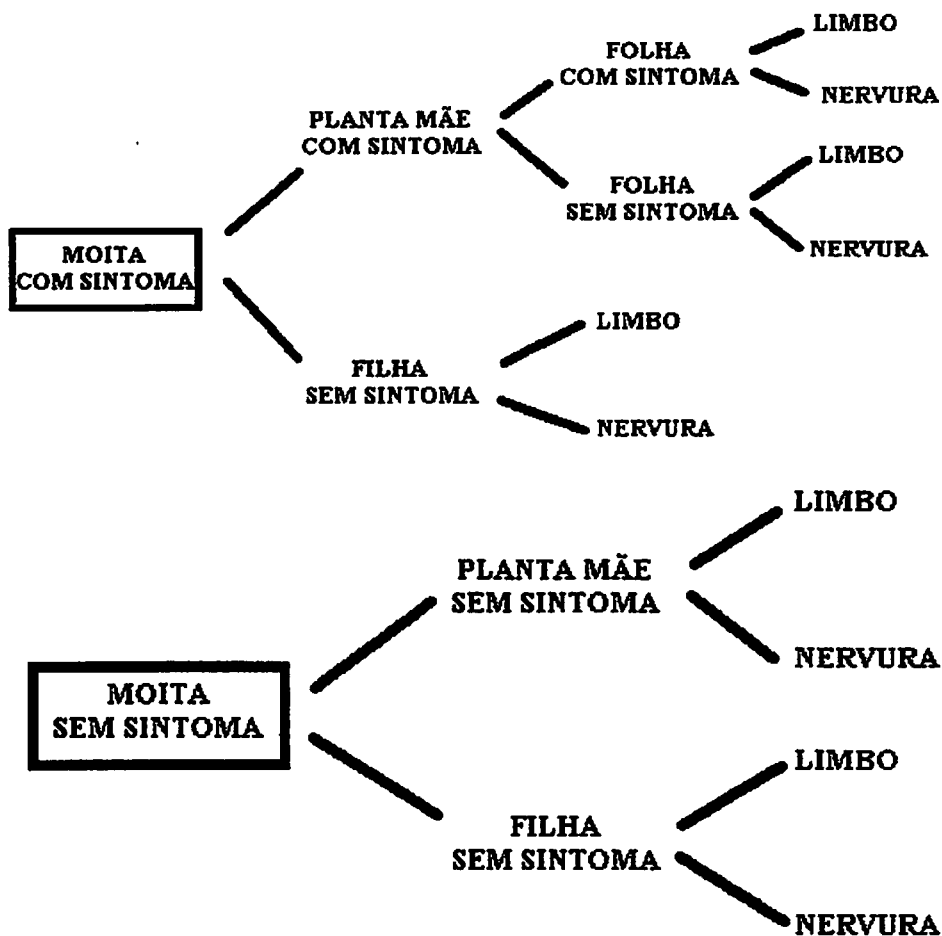
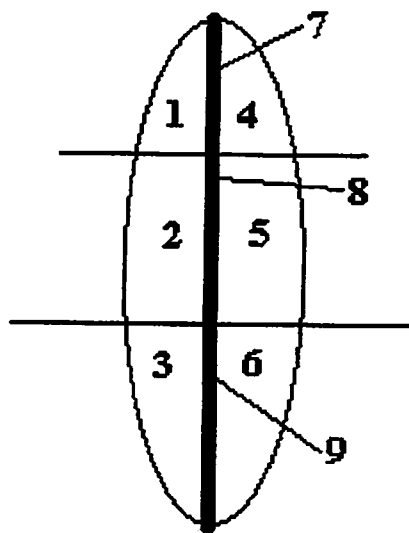


FIGURA 21. Representação esquemática da coleta de amostras de folhas de bananeiras em moitas doentes e sadias. EMBRAPA Milho e Sorgo, Sete Lagoas - MG, 2002.



**FIGURA 22.** Esquema de amostragem dentro da folha de bananeira utilizada na planta A. 1: limbo esquerdo superior; 2: limbo esquerdo médio; 3: limbo esquerdo inferior; 4: limbo direito superior; 5: limbo direito médio; 6: limbo direito inferior; 7: nervura região superior; 8: nervura região mediana e 8: nervura região inferior. EMBRAPA Milho e Sorgo, Sete Lagoas - MG, 2002.

Visando padronizar a forma de armazenamento do material para análise, foi conduzido um experimento onde amostras de folhas de 20 X 20 cm, retiradas de folhas com sintomas típicos de mosaico, cuja presença do vírus foi detectada pelo teste ELISA, foram armazenadas sob diferentes condições (saco de papel; saco plástico; saco plástico + folhas de jornal; saco plástico + folhas de jornal umedecido e nitrogênio líquido) por um período de 10 dias à temperatura ambiente e no escuro. Com exceção do armazenamento em nitrogênio líquido, as demais condições de armazenamento buscaram assemelhar-se às condições pelas quais uma amostra seria submetida quando enviada pelo correio para análise. Diariamente, as amostras foram avaliadas, visualmente, para verificar o

seu estado de conservação. Para cada condição de armazenamento foram utilizadas 3 repetições, das quais a cada 2 dias foram retiradas sub-amostras para análises via ELISA, Dot- Blot e RT-PCR. Após a preparação dos extratos ou da extração do RNA para serem utilizados nos testes, alíquotas desses extratos ou RNAs foram armazenados em freezer  $-80^{\circ}\text{C}$  para serem reavaliados a cada 2 meses por até 4 meses de armazenamento para verificar por quanto tempo a detecção do vírus foi possível.

### **3 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

#### **3.1 EXPERIMENTO I. Comparação da sensibilidade e eficiência dos três testes de diagnose para o CMV.**

O teste RT-PCR foi sensível o suficiente para detectar a presença do plasmídeo clonado com o fragmento de cDNA correspondente a dois terços do gene da capa protéica do CMV até a concentração de  $10 \text{ fg} / \mu\text{L}$  (Figura 22). Para este teste, concentrações inferiores a  $10 \text{ fg} / \mu\text{L}$  não foram capazes de amplificar a banda de 745 pb correspondente a dois terços do gene da capa protéica do CMV.

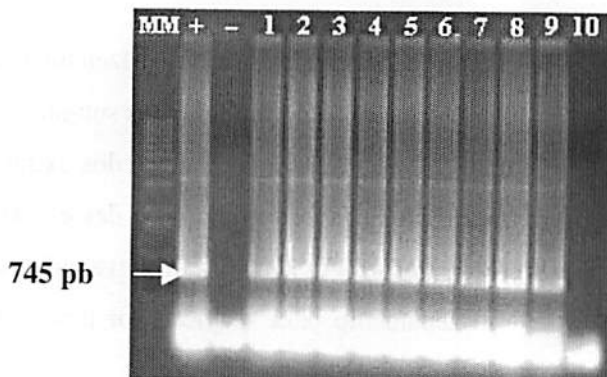


FIGURA 22. Resultado do teste RT-PCR realizado com diferentes concentrações do plasmídeo clonado com fragmento de cDNA correspondente a dois terços do gene da capa protéica do CMV. (MM: Marcador de peso molecular 1 Kb Ladder; +: controle positivo; -: controle negativo; 1: 1  $\mu\text{g} / \mu\text{L}$ ; 2: 100  $\text{ng} / \mu\text{L}$ ; 3: 10  $\text{ng} / \mu\text{L}$ ; 4: 1  $\text{ng} / \mu\text{L}$ ; 5: 100  $\text{pg} / \mu\text{L}$ ; 6: 10  $\text{pg} / \mu\text{L}$ ; 7: 1  $\text{pg} / \mu\text{L}$ ; 8: 100  $\text{fg} / \mu\text{L}$ ; 9: 10  $\text{fg} / \mu\text{L}$ ; 10: 1  $\text{fg} / \mu\text{L}$ ). São consideradas positivas concentrações que amplificaram uma banda de 745 pb. EMBRAPA Milho e Sorgo, Sete Lagoas - MG, 2002.

Hu et al. (1995) em estudo semelhante, utilizando partículas virais de CMV purificadas de folhas de tabaco, detectaram a presença do vírus em concentrações de até 100  $\text{fg} / \mu\text{L}$ , ou seja, obtiveram uma sensibilidade 10 vezes menor do que a conseguida neste estudo. Segundo Singh et al. (1995), a sensibilidade desse tipo de teste é influenciada principalmente pela qualidade das enzimas Reverse transcriptase e Taq polimerase utilizadas na execução do teste.

A utilização do teste de hibridação Dot – Blot permitiu detectar a presença do plasmídeo até 100  $\text{pg} / \mu\text{L}$  (Figura 23). Esta sensibilidade foi 100 vezes superior à encontrada por Hu et al. (1995).

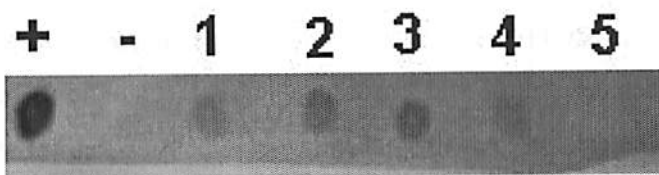


FIGURA 23. Resultado do teste Dot-Blot realizado com diferentes concentrações do plasmídeo clonado com fragmento de cDNA correspondente a dois terços do gene da capa protéica do CMV. (+: controle positivo; -: controle negativo; 1: 100 ng /  $\mu$ L; 2: 10 ng /  $\mu$ L; 3: 1 ng /  $\mu$ L; 4: 100 pg /  $\mu$ L; 5: 10 pg /  $\mu$ L). São consideradas positivas as concentrações que sensibilizaram o filme (manchas circulares). EMBRAPA Milho e Sorgo, Sete Lagoas - MG, 2002.

Kiranmai et al. (1998), obteve em seus estudos comparativos entre sondas marcadas com  $^{32}$ P e digoxigenina uma sensibilidade de 40 pg /  $\mu$ L e 150 pg /  $\mu$ L, respectivamente. Esta menor sensibilidade associada ao impacto ambiental, segurança durante o uso e posterior descarte, menor durabilidade, dificuldade para a compra e o custo de marcadores radioativos reafirmam a superioridade das sondas marcadas a frio em relação às marcadas radioativamente.

A maior sensibilidade encontrada por Kiranmai et al. (1998) pode ser justificada, pois a sonda utilizada nesse estudo havia sido marcada a pelo menos um ano e a utilizada por Kiranmai et al. (1998) foi utilizada imediatamente após a sua marcação. Segundo Dietzgen et al. (1994) sondas marcadas quimicamente armazenadas por mais de um ano, mesmo em condições ideais, reduzem sua sensibilidade, mas não se tornam obsoletas.

A sensibilidade de 100 ng /  $\mu$ L foi alcançada utilizando-se o teste ELISA (Tabela 8 e Figura 24). Este resultado coincide com o obtido por Hu et al. (1995) utilizando o teste ELISA. Isto era esperado uma vez que em ambos os



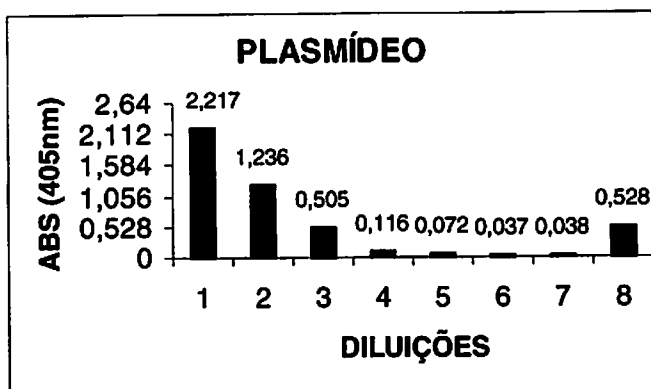
trabalhos foram utilizados Kits Direct ELISA CMV da Agdia Company. No entanto, Hsu et al. (2000), em seu trabalho utilizaram anticorpos produzidos em ratos para a detecção do CMV em bananeira obtiveram uma sensibilidade suficiente para detectar o vírus em concentrações superiores a 1 ng /  $\mu$ L.

TABELA 8. Resultados das leituras de absorbância a 405nm do teste ELISA realizado com diluições do plasmídeo. EMBRAPA Milho e Sorgo, Sete Lagoas - MG, 2002.

<b>CONCENTRAÇÕES DE PLASMÍDEOS</b>	<b>I</b>	<b>II</b>	<b>III</b>	<b>MÉDIA</b>
1 $\mu$ g / $\mu$ l	2,200	2,649	1,804	2,217
100 ng / $\mu$ l	1,666	1,043	1,001	1,236
10 ng / $\mu$ l	0,537	0,483	0,497	0,505
1 ng / $\mu$ l	0,103	0,148	0,096	0,116
100 pg / $\mu$ l	0,040	0,138	0,038	0,072
10 pg / $\mu$ l	0,047	0,027	0,037	0,037
1 pg / $\mu$ l	0,052	0,030	0,034	0,038
CONTROLE (+)	1,907	2,103	1,834	1,948
CONTROLE (-)	0,213	0,307	0,272	0,264 (0,528)*

I, II, III: Repetições das mesmas diluições realizadas em placas diferentes.

\* Valor de referência = 2 vezes o valor do controle negativo.



**FIGURA 24.** Teste ELISA realizado com diferentes concentrações de plasmídeos clonados com o fragmento de cDNA correspondente a dois terços do gene da capa protéica do CMV. (1: 1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ; 2: 100  $\text{ng}/\mu\text{L}$ ; 3: 10  $\text{ng}/\mu\text{L}$ ; 4: 1  $\text{ng}/\mu\text{L}$ ; 5: 100  $\text{pg}/\mu\text{L}$ ; 6: 10  $\text{pg}/\mu\text{L}$ ; 7: 1  $\text{pg}/\mu\text{L}$ ; 8: valor de referência). São consideradas positivas as diluições cujas absorbâncias são maiores do que o valor de referência. EMBRAPA Milho e Sorgo, Sete Lagoas - MG, 2002.

Kiranmai et al. (1998), comparando ELISA Sandwich, ELISA Direto e ELISA Indireto obtiveram a mesma sensibilidade que a encontrada nesse trabalho independente do tipo de ELISA utilizado para a detecção do CMV, em amostras de folhas de bananeiras. No entanto, ressaltou-se que o teste ELISA Direto por ser o mais econômico, rápido, versátil e passível de automação, deve ser o preferencial para análise de grandes quantidades de amostras.

Comparando os resultados pode-se inferir que, o RT-PCR foi 1000 vezes mais sensível do que o teste Dot Blot e este cerca de 100 vezes mais sensível que o ELISA.

Quanto à eficiência dos testes, pode-se observar na Figura 25 que, a utilização do teste RT-PCR permitiu a detecção do vírus em amostras diluídas até 1.000.000 vezes nas plantas A e B e até 100.000 vezes no extrato foliar da planta C. A menor eficiência do teste na planta C pode ser explicada pelas suas

folhas quase não apresentarem sintomas causados pelo vírus, indicando menor concentração deste vírus na planta C, portanto menor quantidade do RNA do vírus foi extraída junto com o RNA Total.

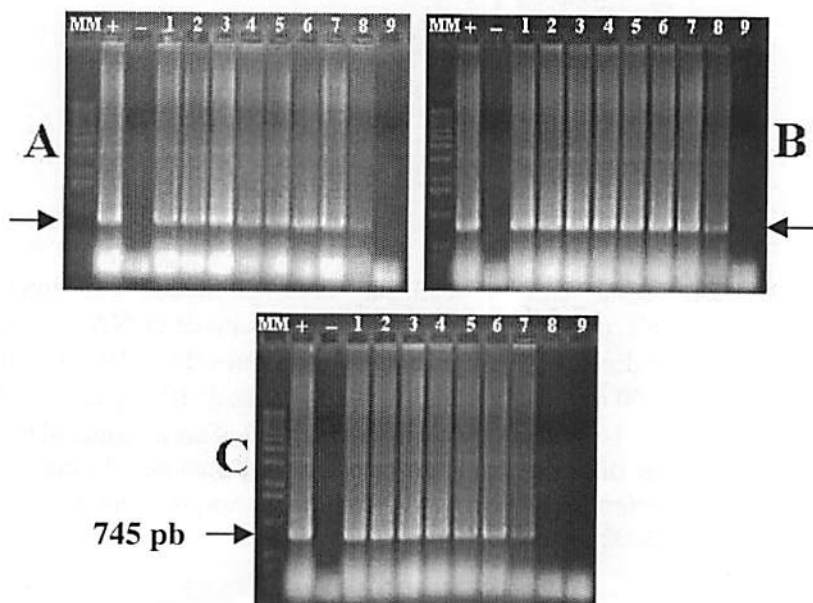


FIGURA 25. Teste RT-PCR realizado com diferentes diluições do RNA extraído das plantas A, B e C. (MM: marcador de peso molecular; (+) controle positivo; (-) controle negativo; 1: 500 ng/ $\mu$ L; 2:1X; 3: 10X; 4: 100X; 5: 1.000X; 6: 10.000X; 7: 100.000X; 8: 1.000.000X; 9: 10.000.000X). São consideradas positivas as diluições que amplificaram a banda de 745 pb. EMBRAPA Milho e Sorgo, Sete Lagoas - MG, 2002.

Quando utilizado o teste Dot-Blot, não foram observadas diferenças entre os resultados dos testes realizados nas três plantas (Figura 26). No entanto, este teste foi 1000 vezes menos eficiente do que o RT-PCR, conseguindo detectar a presença do vírus até a diluição de 1000 vezes no extrato bruto.

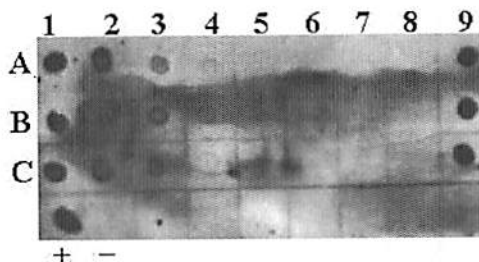


FIGURA 26. Teste Dot-Blot realizado com diferentes diluições do extrato foliar preparado para análise. ((+) controle positivo; (-) controle negativo; 1: 1X; 2: 10X; 3: 100X; 4: 1.000X; 5: 10.000X; 6: 100.000X; 7: 1.000.000X; 8: 10.000.000X; 9: extrato bruto). São consideradas positivas as diluições que sensibilizaram o filme (manchas circulares). EMBRAPA Milho e Sorgo, Sete Lagoas - MG, 2002.

Também não foram encontradas diferenças no teste ELISA realizado nas plantas A, B e C. Em todas as amostras o teste detectou a presença do vírus em diluições de até 10 vezes no extrato bruto (Tabela 9 e Figura 27). O teste ELISA foi 100 vezes menos eficiente que o teste Dot-Blot e 100.000 vezes menos efetivo do que o RT-PCR.

TABELA 9. Resultados das leituras de absorvância a 405nm do teste ELISA realizado com diluições dos extratos foliares. EMBRAPA Milho e Sorgo, Sete Lagoas - MG, 2002.

DILUIÇÕES	I	II	III	MÉDIA
<b>PLANTA A</b>				
EXTRATO BRUTO	3,046	2,300	2,242	2,588
1 X	1,746	0,998	1,342	1,362
10 X	0,842	0,745	0,597	0,728
100 X	0,224	0,315	0,122	0,221
1000 X	0,048	0,112	0,132	0,097
CONTROLE (+)	2,204	2,580	2,004	2,262
CONTROLE (-)	0,428	0,375	0,219	0,341 (0,682)*
<b>PLANTA B</b>				
EXTRATO BRUTO	2,694	1,743	0,892	1,776
1 X	0,997	1,103	1,002	1,034
10 X	0,774	0,699	0,691	0,721
100 X	0,542	0,600	0,407	0,516
1000 X	0,109	0,074	0,091	0,091
CONTROLE (+)	2,204	2,580	2,004	2,262
CONTROLE (-)	0,453	0,350	0,219	0,341 (0,682)*
<b>PLANTA C</b>				
EXTRATO BRUTO	1,503	1,907	1,334	1,581
1 X	1,042	1,892	0,996	1,310
10 X	1,002	1,124	0,764	0,963
100 X	0,746	0,402	0,329	0,493
1000 X	0,096	0,042	0,111	0,083
CONTROLE (+)	2,204	2,580	2,004	2,262
CONTROLE (-)	0,400	0,428	0,387	0,402 (0,804)*

I, II, III: Repetições das mesmas diluições realizadas em placas diferentes.

\* Valor de Referência = 2 vezes o valor da leitura do controle negativo.

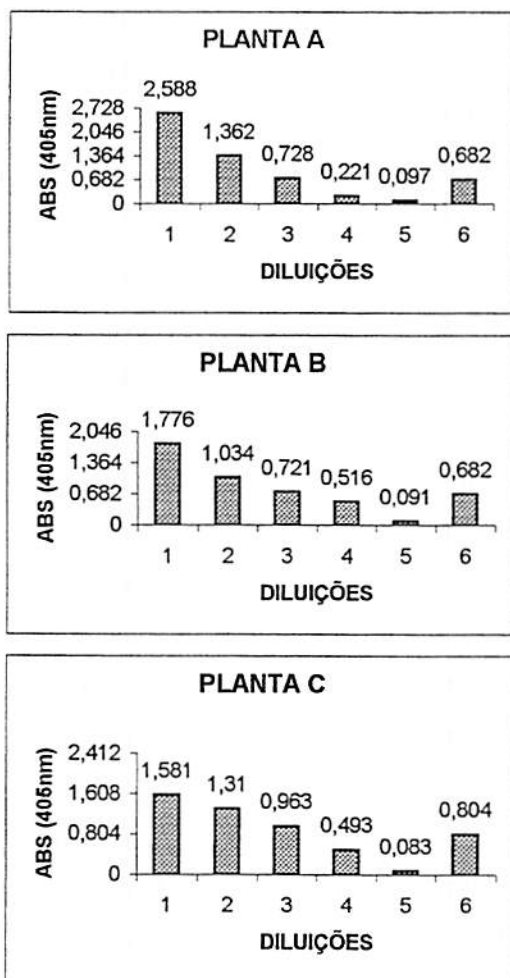


FIGURA 27. Teste ELISA realizado com diferentes diluições do extrato foliar preparado para análise. (1: extrato bruto; 2: 1X; 3: 10X; 4: 100X; 5: 1.000X; 6: valor de referência). São consideradas positivas as diluições cujas absorvâncias são maiores do que o valor de referência. EMBRAPA Milho e Sorgo, Sete Lagoas - MG, 2002.

Por se tratar de uma metodologia que utiliza primers específicos e complementares a uma determinada seqüência genética pertencente exclusivamente ao material genético do fitopatógeno, os chamados métodos

moleculares, como o RT-PCR, tendem a ser muito mais sensíveis e eficientes do que os métodos colorimétricos e de hibridação com sondas marcadas. Um outro problema não encontrado no RT-PCR é o “falso positivo”, o que seria mais comumente detectado em testes sorológicos que utilizam anticorpos policlonais (Coote, 1990). A ocorrência de “falso positivo” nos métodos de hibridação também é bem remota, uma vez que esta técnica é baseada no anelamento de uma sonda marcada a uma seqüência específica do material genético do fitopatógeno. No entanto, o aparecimento de “background” nos filmes de raios-X pode dificultar a visualização dos resultados (Palukaitis, 1998).

Embora os métodos sorológicos sejam freqüentemente utilizados na detecção rotineira de vírus de plantas, a hibridação de ácidos nucléicos permite testes mais sensíveis e específicos quando comparados com estes.

Apesar do teste RT-PCR ter se mostrado muito mais eficiente e sensível do que os demais utilizados, sua aplicação em programas de indexação de mudas de bananeiras ficaria restrito à indexação das matrizes doadoras de meristemas, devido ao seu alto custo e sofisticação. A análise de 100 amostras por RT-PCR custaria em torno de R\$1300,00 (Anexo 3a), enquanto que as mesmas 100 amostras realizadas pelos testes Dot-Blot e ELISA custariam em torno de R\$ 102,00 e R\$ 175,00, respectivamente (Anexo 3b e 3c). Além disso, para a realização do teste RT-PCR haveria a necessidade de um laboratório bem equipado e em condições de realizar extrações de RNA em um grande número de amostras ao mesmo tempo. Na prática, a extração de RNA de um grande número de amostras seria o fator mais limitante da técnica.

O teste Dot-Blot apresenta o melhor custo-benefício entre os três testes avaliados. Com exceção da obtenção da sonda marcada a frio, os demais passos para a realização do teste são relativamente simples e não necessitam de um laboratório tão bem equipado como para a realização do RT-PCR.



O método ELISA, apesar de apresentar a menor sensibilidade dos três testes, é o oficialmente recomendado para a certificação de mudas de bananeiras pelo Instituto Mineiro de Agropecuária (IMA). O método é particularmente conveniente quando existe um grande número de amostras a serem testadas em um curto espaço de tempo pelos laboratórios de diagnose credenciados. No entanto, para laboratórios de produção de mudas, onde a quantidade de amostras não seria tão grande, pode-se recomendar a substituição do teste ELISA pelo Dot-Blot para a realização do controle fitossanitário das mudas.

No anexo 3d, encontra-se a forma de apresentação proposta para o Laudo de Certificação Fitossanitária de mudas de bananeiras.

### **3.2 EXPERIMENTO II. Análise de 52 amostras de folhas de bananeiras através dos três testes de detecção do CMV e padronização do local de amostragem na folha e das condições de armazenamento dos materiais vegetais coletados para análise.**

Segundo os resultados obtidos, o envio de amostras pelo correio deve ser realizado utilizando-se o saco plástico com jornal úmido, exceto para o testes RT-PCR, pois esta forma de armazenamento manteve por mais tempo, 10 dias, a integridade das folhas. A utilização do saco de papel fez com que as folhas de bananeira se apresentassem completamente secas e impróprias para os testes com três dias de armazenamento. Saco plástico ou saco plástico mais jornal seco mantiveram as folhas até o sexto dia de armazenamento, sendo que após este período tornaram-se escurecidas e impróprias para realização dos testes.

O armazenamento em nitrogênio líquido é, sem dúvida, a mais eficiente forma de conservação de amostras, mas seu uso fica limitado a sua falta de praticidade. Uma alternativa à utilização do nitrogênio líquido para o



armazenamento das amostras para realização do teste RT-PCR seria o armazenamento e envio pelo correio das amostras foliares mantidas em meio de cultura. A necessidade de um material vegetal íntegro é o fator limitante desta técnica (Gafny et al., 1996).

Através do teste RT-PCR foi possível detectar a presença do vírus apenas nas amostras armazenadas em nitrogênio líquido, nas três repetições (Figura 28). Isto era esperado devido ao RNA ser uma molécula altamente instável e portanto facilmente degradado. Apesar de alguns RNAs não apresentarem as bandas bem definidas no gel de agarose, não foram observados problemas para a detecção do vírus nestas amostras. O não aparecimento das bandas no gel pode ter sido decorrente da baixa eficiência do método de extração nestas amostras. Os RNAs armazenados a  $-80^{\circ}\text{C}$  mantiveram-se íntegros durante os quatro meses em que foram utilizados para o teste RT-PCR (Figura 29 e 30).

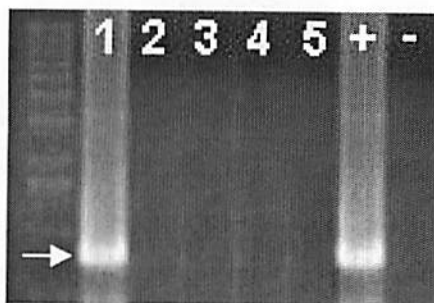


FIGURA 28. RT-PCR de amostras de folhas de bananeiras armazenadas sob diferentes formas por 2 dias. (1: Nitrogênio Líquido; 2: Saco de papel; 3: Saco Plástico; 4: Saco Plástico + Jornal; 5: Saco Plástico + Jornal Úmido; +: controle positivo; -: controle negativo). EMBRAPA Milho e Sorgo, Sete Lagoas - MG, 2002.

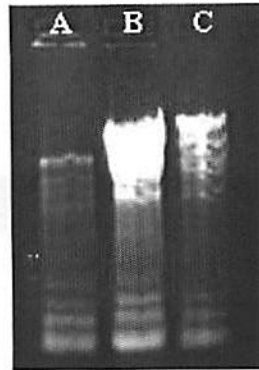


FIGURA 29. RNAs extraídos de folhas de bananeiras armazenadas em nitrogênio líquido por diferentes períodos de tempo. A: 2 dias de armazenamento; B: 2 meses de armazenamento e C: 4 meses de armazenamento. EMBRAPA Milho e Sorgo, Sete Lagoas - MG, 2002.

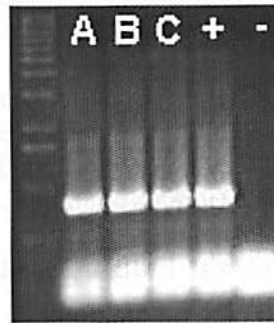


FIGURA 30. Bandas de 745pb obtidas via RT-PCR a partir de RNA extraído de planta infectada armazenado por diferentes períodos de tempo. (A: 2 dias de armazenamento; B: 2 meses de armazenamento e C: 4 meses de armazenamento; +: controle positivo; -: controle negativo). EMBRAPA Milho e Sorgo, Sete Lagoas - MG, 2002.

Em todas as repetições, os testes ELISA e Dot-Blot não diferiram em seus resultados. Ambos foram capazes de detectar a presença do vírus em amostras armazenadas em saco de papel até o segundo dia de armazenamento, até o sexto dia armazenamento em saco plástico com ou sem jornal seco e em

saco plástico com jornal úmido ou nitrogênio líquido por 10 dias (Figura 31 e 32).

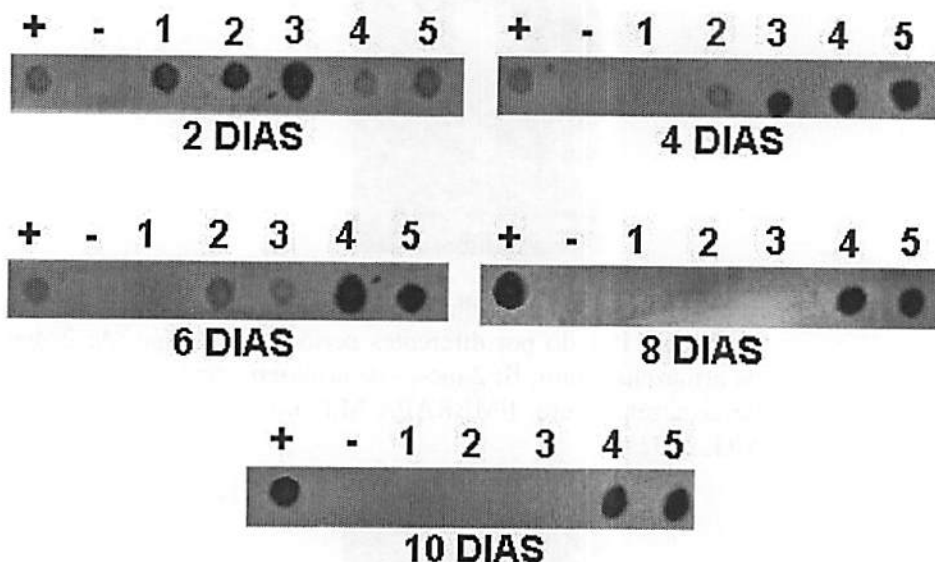
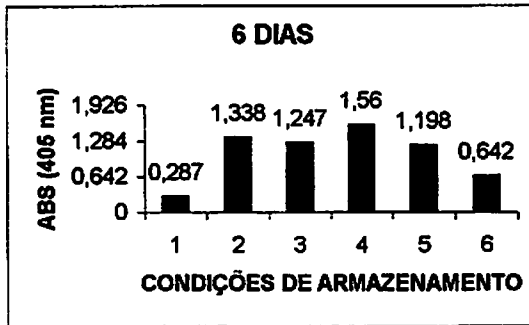
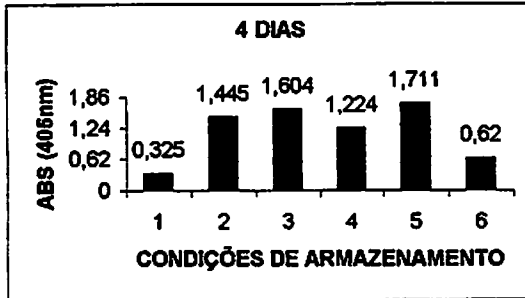
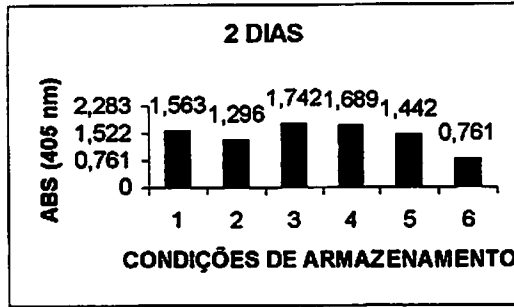


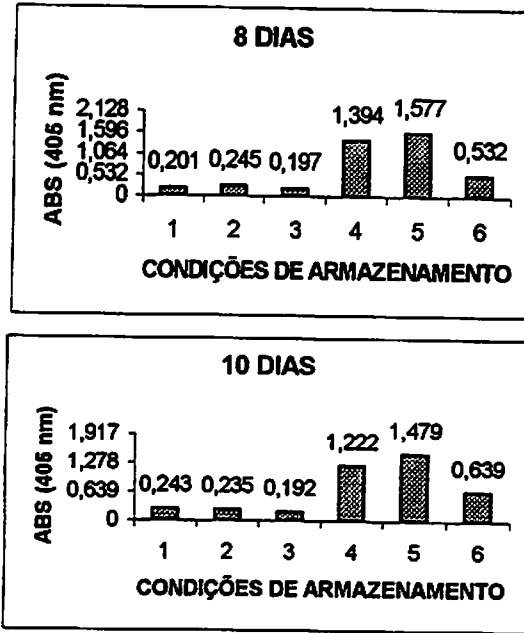
FIGURA 31. Resultados dos testes Dot-Blot realizados com as amostras armazenadas sob diferentes condições por 2, 4, 6, 8 e 10 dias (1: saco de papel; 2: saco de plástico; 3: saco plástico + jornal; 4: saco plástico + jornal úmido; 5: nitrogênio líquido). São consideradas positivas as amostras que sensibilizaram o filme (manchas circulares). EMBRAPA Milho e Sorgo, Sete Lagoas - MG, 2002.



**FIGURA 32.** Resultados do teste ELISA realizados com as amostras armazenadas sob diferentes condições por 2, 4, 6, 8 e 10 dias (1: saco de papel; 2: saco de plástico; 3: saco plástico + jornal; 4: saco plástico + jornal úmido; 5: nitrogênio líquido; 6: valor de referência). São considerados positivos os valores maiores do que o valor de referência. EMBRAPA Milho e Sorgo, Sete Lagoas - MG, 2002.

...continua...

FIGURA 32. Cont.



Os extratos armazenados a  $-80^{\circ}\text{C}$  oriundos de folhas armazenadas em saco plástico com jornal úmido e em nitrogênio líquido permaneceram em condições de utilização até o quarto mês de armazenamento (Figura 33 e 34).

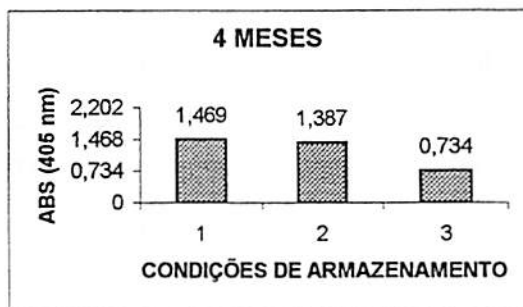


FIGURA 33. Resultados do teste ELISA realizado com extratos armazenados a  $-80^{\circ}\text{C}$  por 4 meses (1: saco plástico + jornal úmido; 2: nitrogênio líquido; 3: valor de referência). São considerados positivos os valores maiores do que o valor de referência. EMBRAPA Milho e Sorgo, Sete Lagoas - MG, 2002.



FIGURA 34. Resultados do teste Dot-Blot realizados com extratos armazenados a  $-80^{\circ}\text{C}$  por 4 meses (+: controle positivo; -: controle negativo; 1: saco plástico + jornal úmido; 2: nitrogênio líquido). São consideradas positivas as amostras que sensibilizaram o filme (manchas circulares). EMBRAPA Milho e Sorgo, Sete Lagoas - MG, 2002.

Os resultados obtidos nos três testes para as 52 amostras de folhas de bananeiras enviadas podem ser observados na Tabela 10 e nas Figuras 35e 36.

Independentemente da metodologia de detecção empregada, foi possível detectar a presença do vírus em todas as amostras de folhas da planta adulta pertencentes à moita infectada 1. A não percepção visual dos sintomas característicos causados pelo CMV, como nas amostras 3 e 4, não implica que o

tecido esteja isento de vírus. Segundo Mossop e Francki (1978), alguns isolados de CMV podem conter uma quinta molécula de RNA, denominada RNA satélite (satRNA), que apesar do seu pequeno tamanho, pode alterar drasticamente a replicação e expressão dos sintomas causados pelo CMV, induzindo desde atenuação até acentuação dos sintomas. Na maioria dos isolados de satRNA já estudados, mostrou que este tipo de RNA atenua os sintomas virais nas plantas infectadas pelo CMV (Jacquemond e Leroux, 1982; Garcia-Arenal et al., 1987).

Nas amostras retiradas da filha desta mesma moita 1, apenas o teste RT-PCR foi capaz de detectar a presença do vírus. Como a filha em questão estava nos estágios iniciais do seu crescimento, com aproximadamente 15 cm de altura, a concentração de partículas virais possivelmente era muito baixa, possibilitando apenas sua detecção pelo teste RT-PCR, o mais sensível entre eles.

Resultados semelhantes para a planta adulta da moita 2 foram observados. No entanto, nenhum dos três testes foi capaz de detectar a presença do vírus nas amostras retiradas da filha desta moita.

Apesar dos poucos trabalhos relacionados a translocação do CMV em bananeiras, Ding (1997) afirma que o produto do gene 2b do CMV, além de ser um fator de virulência, também está envolvido na movimentação da partícula viral a longas distâncias. Contudo, não se sabe ao certo os fatores que estão envolvidos nesta translocação, mas sabe-se que existem fatores que bloqueiam esta translocação a longa distância.

Outra explicação para a não detecção do vírus na filha seria que a baixa concentração de partículas virais existentes, não foi capaz de ser detectada pelo teste RT-PCR.

Na moita infectada 3, todas as amostras oriundas da planta mãe apresentaram-se infectadas pelo vírus. Nas amostras retiradas da filha, apenas o teste ELISA não foi capaz de detectar a presença do vírus. Isto pode ser explicado pela menor sensibilidade e eficiência demonstrada pelo teste.

Com exceção da amostra 24 (Moita Sadia 2, planta adulta sem sintoma – nervura) todas as amostras provenientes das três moitas sadias foram consideradas não infectadas pelo CMV, independentemente do teste utilizado. Na amostra 24, apenas o teste ELISA detectou a presença do vírus. Segundo Coote (1990), problemas de “falso positivo” são possíveis de ocorrerem em testes colorimétricos.

A presença do vírus foi confirmada em todas as amostras retiradas da folhas 1 da planta A, independentemente do teste utilizado. Dentre todas as amostras da folha 2, apenas o teste ELISA não foi capaz de detectar a presença do vírus na amostra formada pelo limbo foliar. Nesta mesma amostra, os testes RT-PCR e Dot-Blot confirmaram a infecção pelo CMV. Mais uma vez, atribui-se esta não detecção a baixa concentração viral ou a problemas ocorridos durante a execução do teste.

As amostras das folhas 3 e 4 da planta A, independentemente do local de amostragem, foram consideradas positivas nos três testes. Este resultado indica que o local de amostragem dentro da folha, apresentando ou não sintomas, não interfere nos resultados. No entanto, como o vírus é translocado preferencialmente pelos feixes vasculares das folhas, deve-se dar preferência por coletar amostras do limbo foliar da região mediana da folha que apresentem sintomas e próxima a nervura, à semelhança do método de amostragem utilizado para análise dos teores de minerais em folhas de bananeira (Alves, 1999). Amostras de tecidos da nervura são mais difíceis de serem preparados para as análises e apresentam maior quantidade de substâncias que podem interferir nos resultados.

Em plantas que não apresentam sintomas de infecção por CMV, deve-se seguir a Norma Internacional para Determinação do Estado Nutricional de Bananeiras elaborada por Martin – Prével (1984), onde estabelece que a folha amostrada de ser a terceira a contar do ápice da planta.



**TABELA 10.** Resultados dos testes RT-PCR, Dot-Blot e ELISA aplicados em 52 amostras coletadas no município de Andradas – MG. (+: amostras infectadas; -: amostras sadias). EMBRAPA Milho e Sorgo, Sete Lagoas - MG, 2002.

<b>AMOSTRAS</b>	<b>RT-PCR</b>	<b>Dot-Blot</b>	<b>ELISA*</b>	<b>ABS (405nm)</b>
1	+	+	+	1,476
2	+	+	+	1,333
3	+	+	+	1,569
4	+	+	+	0,666
5	+	-	-	0,528
6	+	-	-	0,499
7	+	+	+	1,321
8	+	+	+	1,098
9	+	+	+	0,891
10	+	+	+	1,553
11	-	-	-	0,371
12	-	-	-	0,269
13	+	+	+	1,001
14	+	+	+	1,042
15	+	+	+	1,369
16	+	+	+	1,667
17	+	+	-	0,642
18	+	+	-	0,421
19	-	-	-	0,499
20	-	-	-	0,501
21	-	-	-	0,528
22	-	-	-	0,397
23	-	-	-	0,532
24	-	-	+	0,911
25	-	-	-	0,7
26	-	-	-	0,554
27	-	-	-	0,354
28	-	-	-	0,612
29	-	-	-	0,421
30	-	-	-	0,672
31	+	+	+	1,773
32	+	+	+	1,668

...continua...

**Tabela 10. Cont.**

<b>33</b>	+	+	-	<b>0,512</b>
<b>34</b>	+	+	+	<b>1,003</b>
<b>35</b>	+	+	+	<b>1,293</b>
<b>36</b>	+	+	+	<b>1,834</b>
<b>37</b>	+	+	+	<b>1,511</b>
<b>38</b>	+	+	+	<b>1,368</b>
<b>39</b>	+	+	+	<b>1,599</b>
<b>40</b>	+	+	+	<b>1,294</b>
<b>41</b>	+	+	+	<b>1,003</b>
<b>42</b>	+	+	+	<b>1,744</b>
<b>43</b>	+	+	+	<b>1,333</b>
<b>44</b>	+	+	+	<b>0,993</b>
<b>45</b>	+	+	+	<b>0,882</b>
<b>46</b>	+	+	+	<b>0,976</b>
<b>47</b>	+	+	+	<b>1,005</b>
<b>48</b>	+	+	+	<b>0,875</b>
<b>49</b>	+	+	+	<b>0,966</b>
<b>50</b>	+	+	+	<b>1,103</b>
<b>51</b>	+	+	+	<b>1,055</b>
<b>52</b>	+	+	+	<b>0,832</b>

\*Valor de referência para ELISA: 0,703

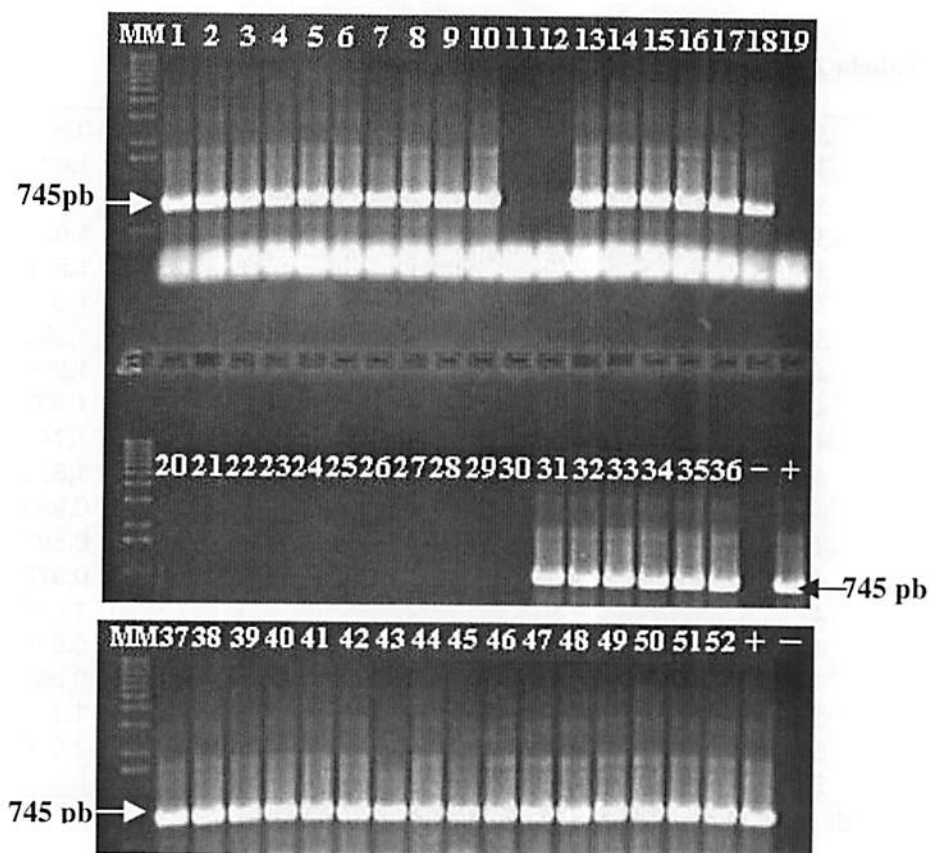


FIGURA 35. Resultado do teste RT-PCR aplicado nas 52 amostras coletadas no município de Andradas – MG. (MM: marcador de peso molecular 1 Kb Laedder; 1 – 52: amostras; +: controle positivo; -: controle negativo). Foram consideradas positivas as amostras que amplificaram uma banda de 745pb. EMBRAPA Milho e Sorgo, Sete Lagoas - MG, 2002.

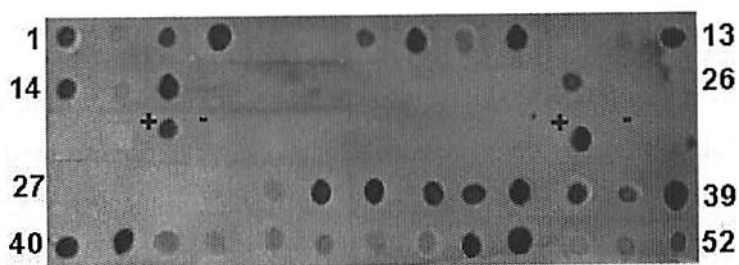


FIGURA 36. Resultado do teste Dot-Blot aplicado nas 52 amostras coletadas no município de Andradas – MG. (+: controle positivo; -: controle negativo; 1 – 52: amostras). São consideradas positivas todas as amostras que sensibilizaram o filme de raio X (manchas circulares). EMBRAPA Milho e Sorgo, Sete Lagoas - MG, 2002.

## 4 CONCLUSÕES

- Os testes RT-PCR, Dot-Blot e ELISA são suficientemente sensíveis para detectar a presença do plasmídeo clonado com o fragmento de cDNA correspondente a dois terços do gene da capa protéica do CMV em concentrações de até 10 fg/ $\mu$ L, 100 pg/ $\mu$ L e 100 ng/ $\mu$ L, respectivamente.
- O teste RT-PCR apresenta-se 1.000 vezes mais eficiente do que o teste Dot-Blot e 100.000 vezes mais do que o ELISA;
- O local de coleta da amostra na folha não interfere nos resultados dos testes;
- Para a realização do teste RT-PCR é necessário o imediato armazenamento das amostras em nitrogênio líquido;
- Para a realização dos testes Dot-Blot e ELISA as amostras podem ser armazenadas por até 10 dias em sacos plásticos contendo jornal úmido;
- É possível detectar a presença do CMV em extratos foliares ou RNAs armazenados por 4 meses a  $-80^{\circ}\text{C}$ ;
- Recomenda-se aplicação do teste RT-PCR apenas nas matrizes que darão início ao processo de produção de mudas.

## 5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVES, E. J. **A cultura da banana: aspectos técnicos, socioeconômicos e agroindustriais**. 2.ed. Brasília: EMBRAPA – SPI / Cruz das Almas: EMBRAPA – CNPMF, 1999. 585p.
- COOTE, J .G. Amplification of nucleic acids by the polymerase chain reaction. Westminster column, p. 57-59, 1990.

DIETZGEN, R. G.; XU, Z.; TEYCHENEY, P. Y. Digoxigenin-labeled cRNA probes for the detection of two potyviruses infecting peanut (*Arachis hypogaea*). *Plant Disease*, v. 78, n. 7, p. 708-711, 1994.

DING, S. W. Molecular basis of the long distance virus movement function encoded by the 2b gene of cucumber mosaic virus. In: *International Congress of Plant Molecular Biology*, 5, 1997, Singapore: The National University of Singapore, and The Institute of Molecular Agrobiolgy. Singapore. 1997. p. 233. Abstracts.

GAFNY, R.; WEXLER, A.; MAWASSI, M.; ISRAELI, Y.; BAR-JOSEPH, M. Natural infection of banana by a Satellite-Containing strain of Cucumber Mosaic Virus: Nucleotide Sequence of the Coat Protein Gene and Satellite RNA. *Phytoparasitica*, v. 21, n. 1, p. 49 – 56, 1996.

GARCIA-ARENAL, F.; ZAITLIN, M.; PALUKAITIS, P. Nucleotide sequence analysis of six satellite RNAs of cucumber mosaic virus. Primary sequence and secondary structure alternations do not correlate with differences in pathogenicity. *Virology*, v.158, n. 2, p. 339-347, 1987.

HSU, J. S.; BARZUNA, L.; HSU, Y. H.; BLISS, W.; PERRY, K. L. Identification and subgrouping of Cucumber mosaic virus with mouse monoclonal antibodies. *Phytopathology*, v. 90, n. 6, p. 615-620, 2000.

HU, J. S.; LI, H. P., BARRY, K.; WANG, M. Comparison of Dot Blot, ELISA, and RT-PCR Assays for Detection of Two Cucumber Mosaic Virus Isolates Infecting Banana in Hawaii. *Plant Disease*, v. 79, n. 9, p.902-906, 1995.

JACQUEMOND, M.; LEROUX, J. L'ARN satellite du virus de la concombres II. Étude de la relation virus-ARN satellite chez divers hôtes. *Agronomie*, v.2, n.1, p. 55, 1982.

KIRANMAI, G.; SATYANARAYANA, T.; SREENIVASULU, P. Molecular cloning and detection of cucumber mosaic cucumovirus causing infectious chlorosis disease of banana using DNA probes. *Current Science*, v. 74, n. 4, p. 356-359. 1998.

MARTIN-PRÉVEL, P. Bananier. In: MARTIN-PRÉVEL, P.; GAGNARD, J.; GAUTIER, P. coord. *L'analyse végétale dans le contrôle de l'alimentation des plantes tempérées et tropicales*. Technique et Documentation-Lavoisier. Paris: p. 715-751, 1984.

MOSSOP, D. W.; FRANCKI, R. I. B. The stability of satellite viral RNA in vivo and in vitro. *Virology*, v. 94, n. 1, p. 243-253, 1978.

PALUKAITIS, P. Preparation and use of cDNA probes for detection of viral genomes. In: WEISSBACH, A. & WEISSBACH, H. (ed) (1998) *Methods for plant molecular biology*. Academic Press, INC. USA.

SANGER, F. NICKLEIN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-termination inhibitors. *Academic Science*, Washington, v. 74, n. 8, p. 5463-5467, 1997.

SINGH, Z.; JONES, R. A. C.; JONES, M. G. K. Identification of Cucumber Mosaic Virus Subgroup I Isolates from banana plants affected by infections chlorosis disease using RT-PCR. *Plant Disease*, v. 79, n. 7, p. 713-716, 1995.

## 6 ANEXOS

### ANEXO 1

Anexo 1a. Lei 6507 de 19 de Dezembro de 1977. e portaria do Ministério da Agricultura nº 386 de 15 de dezembro de 1980 que regulamentam os padrões de qualidade para a produção, transporte e comercialização de mudas de bananeira em todo o território nacional.

#### LEI N. 6.507 - DE 19 DE DEZEMBRO DE 1977

Dispõe sobre a inspeção e a fiscalização da produção e do comércio de sementes e mudas, e dá outras providências

O Presidente da República.

faço saber que o Congresso Nacional decreta e eu sanciono a seguinte Lei:

Art. 1º Ficam estabelecidas a inspeção e a fiscalização da produção e do comércio de sementes e mudas, em todo o Território Nacional.

Parágrafo único. A inspeção e a fiscalização terão por objetivo garantir, com base em padrões oficiais, a qualidade do material produzido e comercializado, estabelecendo condições para o desenvolvimento da produção e do comércio de sementes e mudas.

Art. 2º Consideram-se sementes e mudas, para os efeitos desta Lei e de sua regulamentação, todas as estruturas vegetais, de qualquer espécie ou tipo, provenientes de reprodução sexuada ou assexuada, e que tenham como finalidade a multiplicação de vegetais.

Art. 3º A inspeção e a fiscalização de que trata a presente Lei serão exercidas sobre pessoas físicas e jurídicas, de direito público e privado, que produzam, manipulem, preparem, acondicionem, armazenem, transportem ou comerciem sementes e mudas.

Art. 4º Ficam obrigadas a registrar no Ministério da Agricultura as pessoas físicas e jurídicas, de direito público e privado, que produzam, beneficiem ou comerciem sementes e mudas.

Art. 5º Compete ao Ministério da Agricultura, por intermédio de seus órgãos específicos, exercer a inspeção e a fiscalização de que trata a presente Lei.

§ 1º O Ministério da Agricultura poderá celebrar convênios com órgãos e entidades da Administração Federal, Estados, Distrito Federal e Territórios, para a execução dos serviços de inspeção e fiscalização previstos nesta Lei.

§ 2º Compete privativamente ao Ministério da Agricultura exercer a inspeção e a fiscalização do comércio internacional de sementes e mudas.



**Art. 6º** O Poder Executivo adotará as providências necessárias ao estabelecimento de mecanismos de coordenação e execução necessários ao exercício das atividades previstas nesta Lei.

**Art. 7º** Os serviços de inspeção e fiscalização, de que trata a presente Lei, serão remunerados pelo regime de preços públicos, cabendo ao Ministro de Estado da Agricultura fixar os valores de custeio.

§ 1º Na hipótese de esses serviços serem realizados por delegação de competência, nos termos do § 1º, do artigo 5º, a receita decorrente será destinada as entidades ali referidas e aplicadas na manutenção, melhoria, reaparelhamento e expansão das atividades previstas nesta Lei.

§ 2º No Âmbito do Ministério da Agricultura, o recolhimento da receita, proveniente da aplicação da presente Lei, processasse-a de conformidade com o disposto nos artigos 4º e 5º, da Lei Delegada n. 8 (1), de 11 de outubro de 1962.

**Art. 8º** Conforme se dispuser em regulamento e sem prejuízo da responsabilidade penal cabível, a inobservância das disposições desta Lei acarretar, isolada ou cumulativamente, as seguintes sanções administrativas:

- a) advertência;
- b) multa de até 20 (vinte) vezes o maior valor de referência vigente, fixado de acordo com o disposto na Lei n. 6.205 (2), de 29 de abril de 1975;
- c) suspensão da comercialização;
- d) apreensão;
- e) condenação;
- f) suspensão de registro;
- g) cassação de registro.

**Art. 9º** O Poder Executivo baixará, dentro de 90 (noventa) dias, o Regulamento da presente Lei.

**Art. 10.** Esta Lei entrará em vigor 90 (noventa) dias após a data de sua publicação.

**Art. 11.** Ficam revogadas a Lei n. 4.727 disposições em contrario de 13 de julho de 1965, e demais publicação.

A portaria do Ministério da Agricultura nº 386 de 15 de dezembro de 1980 regulamenta os padrões de qualidade para a produção, transporte e comercialização de mudas de bananeira em todo o território nacional.

#### **PORTARIA MA nº 386 DE 15 / 12 / 80**

##### **Mudas de Bananeira**

- a) O pseudocaulé das mudas com rizomas inteiros deve ser aparado entre 5 e 12 cm acima do ponto de inserção da última folha viva

externa ou colo da planta, sendo que o peso varia de acordo com o tipo de muda :

- tipos chifrinho, chifre e guarda chuva: 1.000 a 22.000 gramas;

- tipo chifirão: 2.000 a 3.000 gramas;

- tipo muda alta: 3.000 a 5.000 gramas;

- b) nas mudas do tipo replante, com mais de 5.000 g, o pseudocaule deve ser aparado no comprimento máximo de 50cm;
- c) as mudas tipo pedaço de rizoma devem pesar de 800 a 1.500g, com o pseudocaule aparado entre 5 a 12 cm acima do ponto de inserção ou colo;
- d) todos os tipos de muda devem ter o sistema radicular aparado, para que as raízes apresentem o comprimento máximo de 3 cm;
- e) a comercialização das mudas, que devem estar isentas de pragas e doenças, poderá ser feita a granel, porém protegidas do sol.

A partir desta portaria, cada Comissão Estadual de Sementes e Mudanças estabelece os padrões a serem respeitados pelos produtores em cada Estado da Federação.

Em Minas Gerais, a partir de 1980, a Comissão Estadual de Sementes e Mudanças - CEMM organizou a Sub-comissão de Fruticultura com o objetivo de iniciar, no Estado, o Sistema de Produção de Mudanças Fiscalizadas.

Os produtores de mudanças de Minas Gerais, deverão atender aos padrões mínimos estabelecidos pelo IMA através da portaria nº 095 de 7/01/94.

#### **PORTARIA nº 095/94, DE 7 DE JANEIRO DE 1994.**

#### **DISPÕE SOBRE NORMAS E PADRÕES PARA A PRODUÇÃO DE MUDAS CERTIFICADAS E FISCALIZADAS DE BANANEIRAS**

O DIRETOR-GERAL DO INSTITUTO MINEIRO DE AGROPECUÁRIA-IMA, no uso das atribuições que lhe conferem o artigo 19, incisos I e XI, combinado com o Anexo II, artigos I e XI, do Decreto nº 33.859, de 21 de agosto de 1992, para atender o disposto no artigo 2, inciso VIII, do mesmo diploma legal e dar cumprimento ao que prescreve o artigo 2 da Lei nº 10.594, de 7 de janeiro de 1992, e Anexo XV, inciso VI, do citado Decreto nº 33.859, de 21 de agosto de 1992, considerando o que estabelece o artigo 3 e o seu parágrafo 3º, o artigo 19, inciso I e o artigo 28, inciso I, do Decreto nº 81.771, de 7 de junho de 1978,

#### **RESOLVE:**

Art. 1- Fixar, com base no disposto na Portaria nº 193, de 2 de julho de 1980, letras f e g, normas e padrões para produção de mudanças certificadas e fiscalizadas de bananeiras.

Anexo único desta Portaria.

Art. 2 - Esta Portaria entra em vigor na data de sua publicação.

Registre-se, Publique-se e Cumpra-se.

INSTITUTO MINEIRO DE AGROPECUARIA/MA, em Belo Horizonte, aos 7 de janeiro de 1994,

ANEXO ÚNICO DA PORTARIA nº 095/94, DE 7 DE JANEIRO DE 1994

**NORMAS E PADRÕES PARA A PRODUÇÃO DE MUDAS CERTIFICADAS E FISCALIZADAS DE BANANEIRAS.**

A produção de mudas de bananeiras no Estado de Minas Gerais será executada a partir de:

#### A - VIVEIROS:

##### 1. ORIGEM DO MATERIAL:

as mudas serão obtidas por meio de micropropagação "in vitro" de ápices caulinares ou pelo método de propagação convencional, oriunda de plantas básicas ou plantas matrizes registradas na Autarquia.

##### 2. CLASSES DE MUDAS A SEREM PRODUZIDAS:

mudas fiscalizadas: quando o material utilizado for originário de viveiros registrados na Autarquia ou da micropropagação "in vitro" de bananeiras existentes também registrados na Autarquia, mudas certificadas: quando o material utilizado na micropropagação "in vitro" for originário de plantas básicas ou matrizes registradas na Autarquia ou, ainda, quando utilizado material diretamente originário de plantas básicas ou matrizes também registradas na Autarquia".

##### 3. LOCALIZAÇÃO:

o acesso aos viveiros não poderá dificultar a inspeção e este deverá estar localizado a montante de, no mínimo, 30 (trinta) metros dos bananeis e de outros cultivos, notadamente daqueles hospedeiros de pragas e doenças das bananeiras. Não deverão ser utilizados solos que tenham sido cultivados com bananeiras ou outras culturas hospedeiras de fitoparasitas da bananeiras, por um período mínimo de 3 anos. O viveiro será identificado por uma placa, contendo o nome da cultivar, o mês e o ano de plantio, a arca plantada, o nome do produtor e do responsável técnico, sendo imprescindível o croqui da sua localização.

##### 4. ESPAÇAMENTO:

recomenda-se o espaçamento de 1,0 m a 2,5 m entre linhas e de 0,5 m a 1,5 m entre plantas.

#### 5. TRATOS CULTURAIS:

as práticas de adubação e de irrigação devem ser realizadas de modo a proporcionar um maior vigor e um maior perfilhamento no viveiro. O controle de ervas daninhas deve ser rigoroso, mantendo os viveiros sempre limpos, e periodicamente a partir do momento em que as plantas atinjam 40 (quarenta) cm a 50 (cinquenta) cm de altura, recomenda-se a eliminação das folhas velhas.

#### 6. FITOSSANIDADE:

os viveiros de produção de mudas não devem apresentar histórico dos nematóides *Radopholus similis* (Cavernícola), *Helicotylenchus multicinctus* e *Meloidogyne sp*; *Fusarium oxysporum pv. cubense* (mal-do-Panamá ou Murcha Füsariana); *Pseudomonas solanacearum* (Moco ou Murcha bacteriana); *Erwinia musea* (Erwinia) e viroses (Vírus do Mosaico das Cucurbitáceas).

Deve-se, contudo, efetuar um rigoroso controle da água de irrigação para evitar que se constitua em veículo de disseminação de fitoparasitas. O nível aceitável para *Cosmopolites sordidus* (Moleque da Bananeira) e de 5% (cinco por cento) de presença de galerias.

#### 7. ARRANQUIO DAS MUDAS:

o arranquio das mudas poderá ser feito quando elas atenderem aos seguintes padrões:

a) rizoma inteiro (tipo chifre): devem ter o peso variando entre 1.000 mil e 3.000 mil gramas, sendo que esses pesos referem-se às mudas com rizomas descorticados e com pseudocaules aparados entre 5 (cinco) e 12 (doze) centímetros do ponto de inserção da última folha viva externa (colo);

b) pedaços de rizoma: devem ter o peso variando entre 1000 mil a 2.000 mil gramas;

c) e vedada a comercialização de mudas tipo “guarda-chuva”.

#### 8. PREPARO DAS MUDAS:

as mudas deverão ser descorticadas, eliminando-se todo o tecido necrosado. Recomenda-se o tratamento nematicida, fungicida e inseticida e a desinfecção das ferramentas de trabalho usadas na extração e no preparo das mudas.

#### 9. INSPEÇÃO:

os viveiros deverão passar por, no mínimo, uma inspeção a cada semestre.

#### 10. TRANSPORTE E COMERCIALIZAÇÃO:

as mudas ou os lotes de mudas, a serem comercializados ou transportados, deverão estar devidamente identificados, com etiquetas contendo, no mínimo, o nome, o endereço, o número de registro do produtor e a designação da espécie e da cultivar. Recomenda-se que, uma vez extraída da planta mãe, a muda deve ser comercializada em um período de, no máximo, 7 (sete) dias.

#### **B - BANANAIS EXISTENTES:**

banais já implantados estão aptos a fornecer mudas fiscalizadas visando atender a uma demanda imediata, por um prefixo de 24 (vinte e quatro) meses, contados a partir da publicação da presente Portaria.

#### **CARACTERÍSTICA A SEREM OBSERVADAS:**

##### **1. IDADE:**

as mudas poderão ser extraídas de banais em produção com até 5 anos de idade.

##### **2. LOCALIZAÇÃO:**

o acesso ao banal não pode dificultar a inspeção e este deverá, estar localizado a montante de, no mínimo, 30 m (trinta metros) de banais e de outros cultivos, notadamente daqueles hospedeiros de pragas e doenças das bananeiras.

O banal ser identificado por uma placa contendo o nome da cultivar, o mês e o ano de plantio, a área plantada, o nome do produtor e do responsável técnico, sendo imprescindível o croqui de localização.

##### **3. TRATOS CULTURAIS:**

as práticas de controle de ervas daninhas, adubação, irrigação e desfolha devem ser realizadas de modo a assegurar o vigor do banal.

##### **4. FITOSSANIDADE:**

os banais não deverão apresentar históricos de nematóides *Radopholus similis* (Cavernicola), *Helicotylenchus multisetus* e *Meloidogyne sp*; *Fusarium oxysporum* pv. *cubense* (Mal-do-Panamá ou Murcha Fusariana); *Pseudomonas solanacearum* (Moco ou Murcha Bacteriana); *Erwinia nusea* (Erwinia) e viroses (Vírus do Mosaico das Cucurbitáceas). Deve-se, contudo, efetuar rigoroso controle da água de irrigação para evitar que se constitua em veículo de disseminação de fitoparasitas.

O nível aceitável para *Cosrrupolites sordidus* (Moleque da Bananeira) e de 5% (cinco por cento) nas mudas (presença de traços de galerias).

##### **5. CONDUÇÃO:**

os bananais deverão ser conduzidos de modo a permitir o desenvolvimento de, no máximo, 5 (cinco) brotações simultaneamente por planta.

#### **6. ARRANQUIO:**

arranquio das mudas poderá ser feito quando elas atenderem aos seguintes padrões:

a) rizoma inteiro (tipo chifre): devem ter o peso variando entre 1.000 e 3000 gramas. Esses pesos referem-se a modas com rizomas descorticados, com pseudocaules aparados entre 5 (cinco) e 12 (doze) centímetros do ponto de inserção da última folha viva externa (colo);

b) pedaços de rizoma devem ter peso variando entre 1.000 (mil) e 2.000 (dois mil) gramas;

c) e vedada a comercialização das mudas tipo “guarda chuva”

#### **7. PREPARO DAS MUDAS:**

as mudas deverão ser descorticadas, eliminando-se todo o tecido necrosado. Recomenda-se o tratamento nematicida, fungicida e inseticida e a desinfecção das ferramentas de trabalho usadas na extração e no preparo das mudas.

#### **8. INSPEÇÕES:**

os viveiros deverão passar por, no mínimo, uma inspeção a cada semestre.

#### **9. TRANSPORTE E COMERCIALIZAÇÃO:**

as mudas ou os lotes de mudas, a serem comercializados ou transportados, deverão estar devidamente identificados, com etiquetas contendo, no mínimo, o nome, o endereço, o número de registro do produtor e a designação da espécie e da cultivar. Recomenda-se que, uma vez extraída da planta mãe, a muda deve ser comercializada em um período de, no máximo 7 (sete) dias.

#### **C - MICROPROPAGAÇÃO “IN VTRO”:**

##### **1. SELEÇÃO E COLHEITA DO MATERIAL PROPAGATIVO:**

a) o material utilizado na micropropagação “in vitro” poderá ser originário de plantas básicas ou plantas matrizes registradas na Autarquia dando origem as mudas certificadas ou de viveiros existentes, também registrados na Autarquia, que darão origem as mudas fiscalizadas;

b) da variedade a ser micropropagada deve-se selecionar as plantas saudáveis, com características próprias da cultivar e retirar gemas apicais e/ou laterais de mudas “tipo chifre” ou extrai-las diretamente do tecido meristemático

do “coração”;

c) todo lote de mudas, a ser micropropagada, deverá ser indicado por meio de explantes obtidos de plantas matrizes cultivadas no campo ou em casas de vegetação, sendo proibida a utilização de material *in vitro*”.

## **2. PROECESSO LABORTORIAL:**

a) os explantes extraídos de gemas provenientes de plantas selecionadas (item “a” do nº 1) deverão ser esterilizadas, em condições assépticas para que não comprometam a qualidade fitossanitária das mudas;

b) o número de subculturas não poderá exceder o máximo de 5 (cinco);

c) fica proibido o processo de multiplicação via embriogênese somática, através de “callus” para a produção de mudas comerciais.

## **3. ACLIMATAÇÃO:**

a) as plântulas enraizadas deverão ser cultivadas em estufas ou casas de vegetação, protegidas do contato com afídeos transmissores de viroses e cultivadas em substrato esterilizado, bem como acondicionadas em sacos de polietileno ou em bandejas, até completarem o período de aclimação;

b) durante o período de aclimação, as mudas em formação devem ser observadas para a detecção e a eliminação de todas as plantas com características fora do padrão da variedade a que pertencem;

c) a fase de aclimação deve ocorrer em condições de perfeita higiene, a fim de se evitar o contato com patógenos e insetos prejudiciais a cultura, que possam ser disseminados pela futura muda;

d) o período de aclimação deve perdurar até que as mudas atinjam uma altura mínima de 15 (quinze) centímetros, quando, então, elas poderão ser liberadas aos produtores,

## **4. IDENTIFICAÇÃO:**

a) cada lote de mudas produzido deverá estar identificado com o nome e o número de registro do laboratório produtor, o número do lote, a espécie e a cultivar.

## ANEXO 2

Anexo 2a. Proposta de apresentação de Laudo de Certificação Genética para mudas de bananeiras.

### ANÁLISE GENÉTICA

NÚMERO DA AMOSTRA: Lote 1 (8 plantas Maçã, 10 plantas Prata Anã)

DATA DE RECEBIMENTO: 27 / 09 / 2001

IDENTIFICAÇÃO DA AMOSTRA

Material botânico: rizoma ( ) pseudocaule ( ) folha (X) fruto ( )

Espécie / cultivar: BANANA / Maçã e Prata Anã

PROCEDÊNCIA: Multiplanta Tecnologia Vegetal

PROPRIETÁRIO: Marcos Paiva, Av. Ricarti Teixeira, 1364, Andradas –  
MG, CEP 37795 – 000.

ANÁLISE (s) SOLICITADA (s): Identificação de cultivar

MÉTODO: RAPD / primer OPW 04

### RESULTADOS DA ANÁLISE

Utilizando o primer OPW 04 foi possível diferenciar os materiais enviados para análise e confirmar que:

E<sub>1</sub> (Padrão Biocell – Maçã), M<sub>1</sub>, M<sub>2</sub>, M<sub>3</sub>, M<sub>4</sub>, M<sub>5</sub>, M<sub>6</sub>, M<sub>7</sub>, M<sub>8</sub>, são bananeiras da cv. MAÇÃ.

E<sub>2</sub> (Padrão Biocell – Prata Anã), P<sub>1</sub>, P<sub>2</sub>, P<sub>3</sub>, P<sub>4</sub>, P<sub>5</sub>, P<sub>6</sub>, P<sub>7</sub>, P<sub>8</sub>, P<sub>9</sub>, P<sub>10</sub>, são bananeiras da cv. PRATA ANÃ.



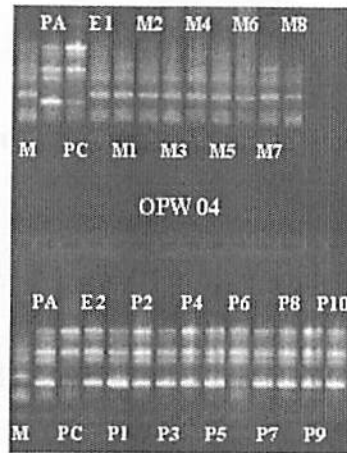


FIGURA 2. Bandas obtidas através do primer RAPD OPW 04, em gel de agarose 1%. EMBRAPA Milho e Sorgo, Sete Lagoas – MG, 2002.

MM – Marcador Molecular

PC – Padrão Prata Comum (NBA)

PA – Padrão Prata Anã (NBA)

PM – Padrão Maçã (NBA)

M1 a M8 – plantas maçã analisadas

P1 a P10 – plantas prata analisadas

E<sub>1</sub> – Padrão Maçã (BIOCELL)

E<sub>2</sub> – Padrão Prata Anã (BIOCELL)

---

**OBSERVAÇÃO:** Esse resultado refere-se apenas a amostras analisadas.

**Técnico Responsável:** \_\_\_\_\_

**Guilherme Augusto C. Gomes**

**02 / 08 / 2001**

### ANEXO 3

**Anexo 3a.** Custo estimado para a indexação de 100 amostras de bananeira pelo teste RT-PCR.

MATERIAL	QTIDADE / REAÇÃO	RS /100 REAÇÕES
TAMPÃO EXTRAÇÃO	500 µl	5,40
CLOROFÓRMIO	1 mL	0,15
FENOL	500 µl	12,50
ETANOL	2 mL	3,00
H <sub>2</sub> O - DEPC	300 µl	0,0543
CORANTE	6 µl	2,64
N <sub>2</sub> LÍQUIDO	50 mL	5,00
AGAROSE	2,6 g	41,60
MARC. MOLEC.	10 µL	0,46
BROMETO DE ETÍDIO	5 µl	0,14
TAQ POLIMERASE	2,5 UNID	286,5
ENZIMA RT	2,5 UNID	600,00
PRIMER 1	2 µl	40,00
PRIMER 2	3 µl	60,00
DNTPs	3 µl	16,20
LUVAS	1 UNID	10,00
PONTEIRAS 200µl	20 UNID	42,00
PONTEIRA 1000µl	10 UNID	30,00
TUBOS 500 µl	3 UNID	45,00
TUBOS 2000µl	4 UNID	80,00
<b>TOTAL</b>		<b>1.230,65</b>

**Anexo 3b.** Custo estimado para a indexação de 100 amostras de bananeira pelo teste Dot-Blot. Não está incluído o custo de obtenção da sonda.

MATERIAL	QTIDADE / REAÇÃO	RS /100 REAÇÕES
TAMPÃO EXTRAÇÃO	500 µl	5,40
MEMBRANA	1 cm <sup>2</sup>	1,94
FILME RAIO-X	1 cm <sup>2</sup>	0,80
BLOC. REAGENT	0,24 / 300	0,08
LAUROYLSARRCOSINE	0,202 / 300	0,06
MgCl <sub>2</sub>	0,00478 / 300	0,0016

ANTI-DIG	1,16 / 300	0,38
AMPPD	20 µL / 300	0,53
SOL. REVELADORA	600 mL	0,008
PONTEIRAS 200 µL	20 UNID	42,00
PONTEIRA 1000µl	10 UNID	30,00
TUBOS 2000µl	4 UNID	15,00
N <sub>2</sub> LÍQUIDO	50 mL	5,00
<b>TOTAL</b>		<b>101,20</b>

Anexo 3c. Custo estimado para a indexação de 100 amostras de bananeira pelo teste ELISA.

MATERIAL	QTIDADE / REACÃO	RS /100 REAÇÕES
KIT AGDIA 100 REAÇÕES		135,00
REAGENTES	1 mL	15,00
PLACA	1 / 96	3,00
PONTEIRAS 200 µL	10	22,00
<b>TOTAL</b>		<b>175,00</b>

Anexo 3d. Proposta de apresentação de Laudo de Certificação Fitossanitária para mudas de bananeiras.

### ANÁLISE FITOSSANITÁRIA

**NÚMERO DA AMOSTRA:** Lote 1 (4 AMOSTRAS BANANEIRAS)

**DATA DE RECEBIMENTO:** 01 / 11 / 2001

**IDENTIFICAÇÃO DA AMOSTRA**

**Material botânico:** rizoma ( ) pseudocaule ( ) folha (X) fruto ( )

**Espécie / cultivar:** BANANA / Matrizes de Prata Anã

**PROCEDÊNCIA:** UMNIVERSIDADE FEDERAL DE LAVRAS

**PROPRIETÁRIO:** Renato Paiva, C.Px 37 Campus Universitário – Depto.

Biologia / UFLA, Lavras- MG, CEP 37200 – 000.

**ANÁLISE (s) SOLICITADA (s): Indexação CMV**

**MÉTODO: RT-PCR**

### **RESULTADOS DA ANÁLISE**

Através do teste RT-PCR foi detectada a presença do vírus do mosaico das cucurbitáceas (CMV) em todas as amostras enviadas para análise, uma vez que em todas as amostras ocorreu a amplificação de uma banda de 745 pb, correspondente a 2/3 do gene da capa protéica do CMV (Figura 1). Portanto, estas plantas não devem ser utilizadas como fonte de explantes para produção de mudas de bananeiras.

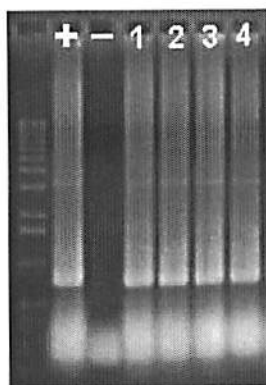


FIGURA 1. Resultado do teste RT-PCR para as quatro amostras enviadas. (+: controle positivo; -: controle negativo; 1 a 4: amostras). EMBRAPA Milho e Sorgo, Sete Lagoas – MG, 2002.

---

**OBSERVAÇÃO:** Esse resultado refere-se apenas a amostras analisadas.

**Técnico Responsável:** \_\_\_\_\_

**Guilherme Augusto C. Gomes**

**02 / 11 / 2001**

