

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



19º Seminário de
Iniciação Científica e
3º Seminário de Pós-graduação
da Embrapa Amazônia Oriental

ANNAIS 2015

19 a 20 de agosto

Embrapa Amazônia Oriental
Belém, PA
2015



AVALIAÇÃO DO BANCO ATIVO DE MANDIOCA DA EMBRAPA AMAZÔNIA ORIENTAL QUANTO ÀS VIROSES

Taise Pereira Carvalho¹, Alessandra de Jesus Boari², Ayane Fernanda Ferreira Quadros¹, Manoel Luiz Andrade da Silva³

¹Bolsista Pibic Embrapa Amazônia Oriental, Laboratório de Fitopatologia, taisepcarvalho@gmail.com

²Pesquisadora Embrapa Amazônia Oriental, Laboratório de Fitopatologia, alessandra.boari@embrapa.br

¹Bolsista Embrapa Amazônia Oriental, Laboratório de Fitopatologia ayanefernanda@hotmail.com

³Assistente Embrapa Amazônia Oriental, Laboratório de Fitopatologia, manoel@hotmail.com

Resumo: O estado do Pará é o principal produtor de mandioca (*Manihot esculenta*) no Brasil, seguido pela Bahia, Maranhã e Paraná. Entretanto, os vírus Cassava vein mosaic virus (CsVMV), Cassava common mosaic virus (CsCMV) e vírus couro de sapo podem causar perdas na produção da mandioca no Brasil. Os sintomas causados por estes vírus são mosaico, nanismo, diminuição do teor de amido, e do tamanho e espessura da raiz, e aumento de fibras. O objetivo deste trabalho foi verificar a presença de viroses no Banco Ativo de Germoplasmas (BAG) de Mandioca da Embrapa Amazônia Oriental. Para isso, foi feita a diagnose visual de três plantas de cada acesso do BAG. As plantas que apresentaram sintomas característicos de viroses tiveram folhas coletadas e transportadas para o laboratório para análise da presença do ácaro sob lupa. Além disso, dez acessos do programa de melhoramento foram analisados via teste sorológico PTA- Elisa indireto, utilizando o antissoro PVX, por apresentar relação sorológica contra o CsVMV. Em seguida, as amostras que apresentaram maior absorvância no teste de Elisa, foram analisadas via RT-PCR utilizando os pares de primers (Potex1; Potex 2) e (CsVMV1; CsVMV2). Não foi detectada a presença vírus via teste molecular. O banco Ativo de Germoplasma de mandioca da Embrapa Amazônia Oriental aparentemente não apresenta viroses.

Palavras-chave: BAG, Cavemovirus, *Manihot esculenta*, Potexvirus

Introdução

A mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) é uma das fontes de carboidratos mais importantes nos países tropicais, sendo considerada à base alimentar da população dos países da América Latina, África e Ásia.



No Brasil, o maior produtor de mandioca é o estado do Pará, seguido de Bahia, Maranhão e Paraná. Embora, o Pará seja o maior produtor dessa cultura, o estado não se destaca como o maior polo industrial do país.

As doenças mais frequentes no Brasil que afeta a mandioca são as causadas por fungos e as de origem viróticas. No Brasil só houve relato do vírus do mosaico comum da mandioca (Cassava common mosaic virus - CsCMV), Vírus do couro de sapo, vírus do mosaico das nervuras (Cassava vein mosaic virus - CsVMV). Os vírus CsCMV e CsVMV são os de maior importância econômica no Brasil.

O CsCMV pertencente ao gênero Potexvirus da família Flexiviridae (SOARES et al., 2009), não possui vetor conhecido, e logo entende-se que sua disseminação ocorre mecanicamente. Os sintomas apresentados em mandiocas infectadas por esse vírus são de mosaico no limbo foliar, presença de áreas cloróticas que são muitas vezes limitadas pelas nervuras. Esse vírus pode causar perdas de rendimento em mais de 30%. O Cassava vein mosaic virus (CsVMV) pertence ao gênero Cavemovirus, da família Caulimoviridae. Os sintomas que este vírus pode causar são mosaico foliar que pode aparecer no início do seu desenvolvimento (THRESH et al., 1994).

Deste modo, este trabalho visou realizar a inspeção visual de todo o BAG de mandioca da Embrapa Amazônia Oriental quanto a presença de sintomas de viroses, e analisar dez acessos de interesse via testes sorológico e molecular quanto à presença de CsCMV e CsVMV.

Material e Métodos

Primeiramente, foi feita a análise de sintomas característicos de viroses como os relacionados acima de todos os acessos do BAG de *Manihot esculenta* (mandioca e aipim) localizado na Embrapa Amazônia Oriental. As folhas e o porte das plantas de cada acesso do BAG foram avaliadas visualmente com base nas características dos sintomas causados por vírus. Por meio de uma planilha relacionou-se o nome da cultivar, onde se anotou a presença ou ausência de sintomas de viroses: CS (com sintoma) e SS (sem sintoma). Os acessos que aparentemente mostraram sintomas de viroses tiveram algumas das suas folhas coletadas e devidamente identificadas com o nome da cultivar, data de coleta e plantio. Foram acondicionadas em caixa de isopor e levadas para o Laboratório de Fitopatologia da Embrapa Amazônia Oriental. Foi feita a visualização das folhas coletadas com auxílio da lupa.



Dez acessos de interesses para lançamento de cultivares foram analisadas por meio dos testes sorológico PTA-ELISA e RT-PCR.

O teste sorológico de ELISA-PTA indireto foi realizado segundo protocolo de Mowat e Dawson (1987). Extrato de 10 cultivares de mandioca foi testado contra o antissoro PVX, que apresenta relacionamento sorológico contra o CsCMV. Foram considerados resultados positivos os valores iguais ou superiores ao dobro da média das leituras de absorbância para os controles sadios (mandioca sadia).

Foi realizada a purificação parcial do vírus, a partir de folhas da mandioca aparentemente com sintomas de viroses utilizando o protocolo de Lane (1992). Após a purificação foi feita a extração do RNA viral, que foi mantido em freezer -20°C. Posteriormente, fez-se o RT-PCR, para detecção do CsCMV onde foi utilizado o par de primer, Potex1 – (5' CAY CAR CAR GCX AAR GAY AS 3') e Potex 2- (5' TCD GTR TTD GCR TCR AAD GT 3') específicos para detecção desse vírus que é um vírus de RNA. Inicialmente foi feita a transcrição reversa para detecção do CsCMV, onde utilizou-se 5 µl do DNA para síntese do cDNA utilizando o primer Potex1. Em seguida, foi realizado o teste de PCR e para isso foram utilizados 5 µl do cDNA, 6 µl do tampão de reação 5X, 3 µl de MgCl₂ (25 mM), 0,5 de dNTP (10 mM), 0,3 µl da Taq DNA Polimerase, 0,5 µl dos primers e 34,7 µl de água ultra-pura. O programa utilizado no termociclador foi o seguinte, 94°C for 3 min; 35 ciclos de 94°C por 3 min, 30 s à 51.5°C e 60 s à 72°C; extensão final de 72°C por 10 minutos. Para detecção do CsCMV foi feito o PCR, pois se trata de um vírus de DNA. O par de primer utilizado foi o CsVMV HS F (GAG TGA GTA GTT TCT TAA TTC TTC) e CsVMV HS R (CTA TCA GCT AAA TTT TCT CTA GC). O programa utilizado no termociclador foi determinado por 3 min a 94 °C para desnaturação; 36 ciclos de 45s a 94 °C, 30s a 50 °C, 72 °C por 50 segundos, extensão por 7 min a 72 °C e 4 °C por ∞. Após as duas reações realizou-se a eletroforese em gel de agarose a 1% para análise do fragmento de DNA.

Resultados e Discussão

Os acessos e suas respectivas variedades utilizadas nas avaliações de preferência foram coletados do Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa Amazônia Oriental, somando um total de 475 materiais. Os acessos não apresentaram sintomas de viroses, o que indica que aparentemente o BAG está livre dos vírus relatados como importantes.



No BAG da Embrapa Mandioca e Fruticultura localizada no Estado da Bahia verificou-se que 68,2% dos 465 acessos de mandioca, apresentaram incidência de plantas com CsVMV e CsCMV. Os materiais apresentavam sintomas de mosaico entre as nervuras das folhas e mosaico nas folhas respectivamente. No BAG da Embrapa Semiárido dos 375 acessos, 135 se encontravam infectadas com o CsVMV. As plantas apresentavam sintomas bem característicos como o mosaico das nervuras.

No Estado do Paraná, foi identificado via teste sorológico a presença de CsCMV em 60 amostras de mandioca provenientes da região de Paranavaí-PR, a avaliação foi feita em um total de 61 amostras, correspondendo a 98,3% das plantas. Também foi feito a avaliação de 20 acessos do Banco de Germoplasma da FEI, onde 15 acessos estavam infectados, ou seja, 75% das amostras apresentaram sintomas de viroses. Das 65 amostras provenientes da micropropagação in vitro, 55 estavam infectadas com o CsCMV, sendo 84,6% das plantas infectadas.

Como todas as plantas do BAG são assintomáticas, futuramente, pretende-se realizar analisar o BAG utilizando-se o teste de RT-PCR e PCR para detectar a presença de vírus por ser mais sensível.

Conclusão

O BAG da Embrapa Amazônia Oriental, aparentemente, se encontra livre da ocorrência de vírus que geralmente causam sintomas.

Agradecimentos

À Fapespa.

Referências Bibliográficas

LANE, L. C. A general method for detecting plant viruses. In: MARAMOROSCH, K. (Ed.). **Plant diseases of viral, viroid, mycoplasma and uncertain origin**. New Delhi, India: Oxford and IBH Publishing, 1992. p. 3-17.

MOWAT, W. P.; DAWSON, S. Detection of plant viruses by ELISA using crude sap extracts and unfractionated antisera. **Journal of Virology Methods**, v. 15, p. 233-247, 1987.



19º Seminário de Iniciação Científica e 3º Seminário de Pós-graduação
da Embrapa Amazônia Oriental

19 a 20 de agosto de 2015, Belém, PA.

SOARES, M. B. B.; VALLE, T. L.; COLARICCIO, A.; FELTRAN, J. C.; LOBO, R. S. V.; MARTINS, A. L. M. Disseminação do vírus do mosaico-comum em área de mandioca (*Manihot esculenta* crantz.). **Revista Raízes e Amidos Tropicais**, Botucatu, v. 5, p. 394-398, jul. 2009. Edição dos Anais do XIII Congresso Brasileiro de Mandioca; VII Workshop sobre Tecnologia em Agroindústrias de Tuberosas Tropicais, Botucatu, 2009.

THRESH, J. M.; FARGETTE, D.; MUKIIBI, J. Research on African cassava mosaic virus: the need for international collaboration. In: TRIENNIAL SYMPOSIUM OF THE INTERNATIONAL SOCIETY FOR TROPICAL ROOT CROPS, 5., 1994, Ibadan. **Root Crops for Food Security in Africa: Proceedings**. Ibadan, Nigeria: IITA, 1994. p. 271-274.