



# XL CONGRESSO PAULISTA DE FITOPATOLOGIA Instituto Agronômico - Campinas, SP

7 a 9 de Fevereiro de 2017

## PRESERVAÇÃO DE *Mycosphaerella fijiensis* PELO MÉTODO DE ARMAZENAMENTO DE FOLHAS DE BANANEIRA DESIDRATADAS

Gustavo Francisco dos Santos<sup>1\*</sup>, Natália Paravati Magalhães<sup>1\*</sup>, Samantha Zanotta<sup>2</sup>, Josiane Takassaki Ferrari<sup>1</sup>, Eliana Borges Rivas<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Instituto Biológico (IB), <sup>2</sup>Pós-graduanda do Curso de Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio do IB; takassaki@biologico.sp.gov.br; \*Bolsistas PIBIC/CNPq.

**RESUMO** - A sigatoka negra, *Mycosphaerella fijiensis*, é considerada uma doença quarentenária A2, presente em alguns estados brasileiros. O Instituto Biológico realiza análises oficiais para detecção de sigatoka negra, desde 2004, quando a doença surgiu no estado de São Paulo, sendo necessário a preservação de contraprova; entretanto, a folha de bananeira oxida rapidamente, dificultando a sua manutenção. O objetivo deste trabalho foi o de avaliar as condições do material genético *Mycosphaerella* em tecidos foliares desidratados pelo método de cloreto de cálcio (CaCl<sub>2</sub>) e herborizados. PCR com *primers* específicos, para as Sigatokas Negra e Amarela, foram realizadas a partir de DNAs totais, extraídos de 22 amostras de folhas de bananeiras preservadas por sete anos e meio em CaCl<sub>2</sub>, e de duas amostras herborizadas há um ano. Todas as 22 amostras desidratadas com CaCl<sub>2</sub> foram positivas para Sigatoka Negra. As amostras herborizadas, uma infectada com Sigatoka Negra e outra com Sigatoka Amarela, apresentaram resultado positivo apenas para a amostra de Sigatoka Negra. O método de armazenamento em CaCl<sub>2</sub> mostrou ser adequado para a preservação do material genético de *M. fijiensis* por, pelo menos, sete anos, sendo possível utilizá-lo como um método para armazenamento de contraprova.

**Palavras-chave:** *Musa* sp., sigatoka, *Mycosphaerella fijiensis*, contraprova, PCR.

## INTRODUÇÃO

As espécies de bananeiras que geram frutos comestíveis pertencem à classe das Monocotiledôneas, ordem Scitaminales, família Musaceae, subfamília Musoideae e gênero *Musa* (SIMMONDS, 1973). Os frutos comestíveis derivam-se das espécies *M. acuminata* e *M. balbisiana*, ambas com 2n=22, e os seus híbridos podem ser gerados tanto na natureza como em laboratório, tendo-se as condições adequadas (MOREIRA, 1999).

Por ser uma planta tropical, os melhores locais para o cultivo da bananeira incluem uma faixa compreendida entre a porção de 30° de latitude norte e sul, com temperaturas entre 10°C e 40°C (GASPAROTTO et al., 2006).

O consumo da banana é tão significativo que a produção em grande escala abrange uma ampla lista de países produtores. Em 2013 o Brasil se destacou com uma produção de 6.892.622 toneladas (IBGE, 2013). Ao longo dos anos, inúmeras variedades de bananas foram obtidas, algumas mais resistentes e outras mais suscetíveis a doenças (DONATO et al., 2006).



# XL CONGRESSO PAULISTA DE FITOPATOLOGIA Instituto Agronômico - Campinas, SP

7 a 9 de Fevereiro de 2017

Entre as doenças mais importantes que afetam a cultura da banana estão a Sigatoka Negra, causada pelo fungo *Mycosphaerella fijiensis* Morelet, com fase anamórfica *Paracercospora fijiensis* (Morelet) Deighton; a Sigatoka Amarela, causada pela *M. musicola* Leach e *M. eumusae* (GASPAROTTO, 2006), sendo esta última, ainda não detectada no Brasil, mais agressiva que a Sigatoka Negra. Todos estes fungos afetam drasticamente o desenvolvimento da planta e a produção de banana.

A sigatoka negra é uma praga quarentenária A2 presente em alguns estados brasileiros. O Instituto Biológico realiza análises oficiais para detecção de sigatoka negra desde 2004, quando a doença surgiu no estado de São Paulo (FERRARI et al., 2005). Por ser doença quarentenária A2, faz-se necessário a preservação de contraprovas como forma de validar o diagnóstico para diferentes fins, porém, as folhas de bananeira oxidam rapidamente. Entre os vários métodos já utilizados para preservação de fungos foi testado o armazenamento de folhas infectadas desidratadas em cloreto de cálcio. Este método de armazenamento é utilizado para a preservação de amostras infectadas por vírus na 'Coleção de Fitovírus Karl Silberschmidt' do Instituto Biológico, por um longo período de tempo.

O objetivo deste trabalho foi o de avaliar as condições do material genético *Mycosphaerella* em tecidos foliares desidratados pelo método de cloreto de cálcio ( $\text{CaCl}_2$ ) e herborizados.

## MATERIAIS E MÉTODOS

No ano de 2009 foram realizadas coletas de folhas de bananeiras em vários municípios do Vale do Ribeira, SP. Todas as amostras foram analisadas para a presença de *M. fijiensis* e *M. musicola* pelos métodos morfológicos e PCR. Destas, 22 amostras de folhas de bananeiras, que apresentaram resultado positivo para *M. fijiensis*, foram armazenadas pelo método de desidratação com  $\text{CaCl}_2$ . Este método consiste em cortar o tecido foliar em pequenos fragmentos, pesá-los e depositá-los sobre tela plástica, para evitar o contato com o  $\text{CaCl}_2$  (1,6g  $\text{CaCl}_2$ / g de folhas), acondicionado em placa de Petri (BARRADAS, 1978). As placas foram então vedadas, identificadas e mantidas a  $-20^\circ\text{C}$ . Após aproximadamente 12 meses, as folhas já desidratadas foram transferidas para tubos plásticos com tampa de rosca, contendo  $\text{CaCl}_2$  até metade de seu volume e algodão para evitar o contato entre a substância desidratante e o tecido foliar. Os tubos foram mantidos a  $-20^\circ\text{C}$  até o momento de se avaliar a viabilidade do genoma do fungo. Duas amostras, armazenadas em herbário por 18 meses, uma infectada com sigatoka amarela e a outra com sigatoka negra, previamente diagnosticadas por



# XL CONGRESSO PAULISTA DE FITOPATOLOGIA Instituto Agronômico - Campinas, SP

7 a 9 de Fevereiro de 2017

método morfológico e PCR, foram também avaliadas quanto à viabilidade dos genomas dos fungos.

As extrações de DNA foram realizadas seguindo protocolo de Dellaporta et al. (1983) com pequenas modificações. Para avaliar a viabilidade dos genomas dos fungos presentes nas amostras foram realizadas PCRs com *primers* de específicos para *M. fijiensis*: MFBF 5'-CGACACAGCAAGAGCAGCTTC-3', MFBRtaq 5'-TTCGAAAGCCTTGGCACTTCAA-3' e *M. musicola*: MMBF 5' – CACACATCAAGAGCAGCACAG – 3', MMBRtaq 5' – TGGCACTTGGCGGAAGTTTG – 3' (ARZANLOU et al., 2007). Reagentes da NeoBio foram utilizadas nas PCRs, de acordo com as instruções do fabricante. Os produtos da PCR foram analisados em eletroforese em gel de agarose 1%.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Das 24 amostras, 23 foram positivas para Sigatoka Negra. As amostras herborizadas em 2015, uma infectada com Sigatoka Negra e outra com Sigatoka Amarela, ambas provenientes de Antonina (PR), apresentaram resultado positivo somente para a amostra infectada com Sigatoka Negra (Tabela 1).

O método de armazenamento em CaCl<sub>2</sub>, mostrou que por, pelo menos, sete anos o material genético de *M. fijiensis* foi preservado, sendo possível utilizá-lo como um método de armazenamento de folhas de bananeira como contraprova. Os resultados mostraram que a partir de tecidos foliares infectados com Sigatoka Amarela, armazenados em herbário, não foi possível detectar este fungo.

A preservação em CaCl<sub>2</sub> de tecidos infectados por fungos possibilita a manutenção de uma coleção biológica, sem alterar o material genético.

**Tabela 1.** Procedência das amostras de folhas de bananeiras e resultado da avaliação por PCR.

Cidade	Coleta	Forma de Armazenamento	Resultado
Miracatu, SP	06/05/2009	CaCl <sub>2</sub>	+ SN / - SA
Itariri, SP	07/05/2009	CaCl <sub>2</sub>	+ SN / - SA
Pedro de Toledo, SP	07/05/2009	CaCl <sub>2</sub>	+ SN / - SA
Miracatu, SP	07/05/2009	CaCl <sub>2</sub>	+ SN / - SA
Juquiá, SP	07/05/2009	CaCl <sub>2</sub>	+ SN / - SA
Registro, SP	07/05/2009	CaCl <sub>2</sub>	+ SN / - SA
Registro, SP	07/05/2009	CaCl <sub>2</sub>	+ SN / - SA
Registro, SP	07/05/2009	CaCl <sub>2</sub>	+ SN / - SA
Sete Barras, SP	07/05/2009	CaCl <sub>2</sub>	+ SN / - SA
Eldorado, SP	07/05/2009	CaCl <sub>2</sub>	+ SN / - SA



# XL CONGRESSO PAULISTA DE FITOPATOLOGIA

## Instituto Agronômico - Campinas, SP

7 a 9 de Fevereiro de 2017

Eldorado, SP	07/05/2009	CaCl <sub>2</sub>	+ SN / - SA
Eldorado, SP	07/05/2009	CaCl <sub>2</sub>	+ SN / - SA
Cajati, SP	07/05/2009	CaCl <sub>2</sub>	+ SN / - SA
Jacupiranga, SP	06/05/2009	CaCl <sub>2</sub>	+ SN / - SA
Jacupiranga, SP	07/05/2009	CaCl <sub>2</sub>	+ SN / - SA
Pariquera-Açu, SP	07/05/2009	CaCl <sub>2</sub>	+ SN / - SA
Pariquera-Açu, SP	07/05/2009	CaCl <sub>2</sub>	+ SN / - SA
Pariquera-Açu, SP	07/05/2009	CaCl <sub>2</sub>	+ SN / - SA
Pariquera-Açu, SP	07/05/2009	CaCl <sub>2</sub>	+ SN / - SA
Pariquera-Açu, SP	07/05/2009	CaCl <sub>2</sub>	+ SN / - SA
Pariquera-Açu, SP	07/05/2009	CaCl <sub>2</sub>	+ SN / - SA
Pariquera-Açu, SP	07/05/2009	CaCl <sub>2</sub>	+ SN / - SA
Antonina, PR	2015	Herborizada	+ SN / - SA
Antonina, PR	2015	Herborizada	- SN / + SA

+: resultado positivo; -: resultado negativo; SA: sigatoka amarela; SN: sigatoka negra.

### CONCLUSÃO

O método de cloreto de cálcio mostrou-se indicado para armazenar amostras de tecido foliar infectado com sigatoka negra.

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARZANLOU, M.; ABELN, E.C.A.; KEMA, G.H.J.; WAALWIJK, C.; CARLIER, J.; VRIES, I.; GUZMÁN, M.; CROUS, P.W. Molecular diagnostics for the sigatoka disease complex of banana. *Phytopathology*, v.97, n.9, p.1112-1118, 2007.

BARRADAS, M.M. Organização de uma coleção de vírus fitopatogênicos em tecidos foliares desidratados em cloreto de cálcio. *O Biológico*, v.44, n.9, p.221-230, 1978.

DELLAPORTA, S.L.; WOOD, J.; HICKS, J.B. A plant DNA minipreparation: version II. *Plant Molecular Biology Reporter*, v.1, p.19-21, 1983.

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



**XL CONGRESSO PAULISTA DE FITOPATOLOGIA**  
**Instituto Agronômico - Campinas, SP**  
**7 a 9 de Fevereiro de 2017**

FERRARI, J.T.; NOGUEIRA, E.M.C.; GASPAROTTO, L.; HANADA, R.E.; LOUZEIRO, I.M. Ocorrência da Sigatoka Negra em bananais no Estado de São Paulo. Arquivos do Instituto Biológico, v.72, n.1, p.133-134, 2005.

GASPARATTO, L.; PEREIRA, J.C.R.; HANADA, R.E.; MONTARROYOS, A.V.V. Sigatoka-negra da bananeira. 1ª ed. Manaus, AM: Embrapa Amazônia Ocidental, 178 p., 2006.

IBGE. Produção agrícola municipal. Disponível em:  
<[http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/pam/2013/default\\_perm\\_xls.shtm](http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/pam/2013/default_perm_xls.shtm)>.  
Acesso em: 09 dez. 2016.

MOREIRA, R. S. Banana – Teoria e Prática de Cultivo. 2ª Ed., CD n.º 222, Fundação Cargill, 1999.

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