

II Simpósio sobre Inovação e Criatividade Científica na Embrapa

Kit diagnóstico para a maior ameaça bananicultura mundial Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, 2010

Miguel Angel Dita¹; Cees Waalwijk², Luciano Paiva³, Gert Kema² e Manoel Souza Jr.⁴ ¹Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical; ²Plant Research International, Holanda; ³Universidade Federal de Lavras; ⁴Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Palavras-chave: Banana; Diagnóstico molecular; *Fusarium oxysporum* f. sp. *cabense*

INTRODUÇÃO

A raça 4 tropical (TR4) de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cabense* (Foc), praga quarentenária A1 para a África e as Américas é atualmente a maior ameaça da bananicultura mundial. Na ausência de variedades resistentes e considerando o tempo necessário para gerar novas cultivares, as medidas de controle mais eficientes são evitar sua entrada e detectar e erradicar focos de infecção. Para tal, um método de diagnóstico rápido, confiável e altamente específico é essencial. Embora um método fora anteriormente proposto (Lin et al. 2008), o mesmo não mostrou especificidade para TR4 (Dita et al. 2010).

METODOLOGIA

Foi realizado o sequenciamento e análises de seqüências de dois *locus*: fator de alongação 1 α e a região IGS (InterGenic Spacer region) de uma coleção de isolados de Foc, representativa de todas as raças e VCGs descritas. Posteriormente foram realizadas análises filogenéticas, busca de SNPs e desenho de primers (Figura 1). A seguir os primers desenhados foram validados em amostras de DNA de plantas infectadas com TR4 e de fungos incluindo outras espécies que não Foc (Figura 2 e 3). Visando evitar falsos negativos foram desenhadas e validadas PCRs duplex tanto para amostras de DNA do patógeno quanto de plantas.

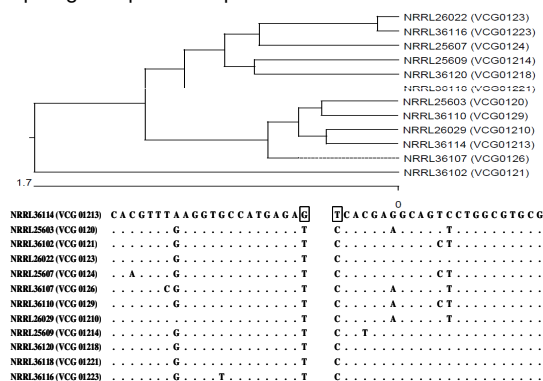


Figura 1. Análises filogenética de isolados de Foc em relação a TR4 (VCG 01213) baseada em seqüências da região IGS (superior). Alinhamento das seqüências IGS mostrando os dois SNPs que foram utilizados para o desenho dos primers (inferior).

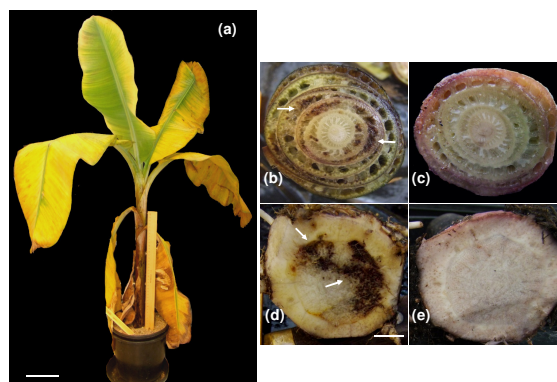


Figura 2. Banana cv. Grand Naine 40 dias após a inoculação com Foc RT4. (a) Sintomas de murchar, barra = 10 cm. (b–d) Cortes transversais de pseudocaulis (b, c) e rizoma (d, e) de planta inoculada (b, d) e não inoculada (c, e); setas mostram necrose causada por Foc TR4; barra = 1 cm

RESULTADOS

Os primers anteriormente propostos (Lin et al., 2008) reagiram com 9 VCGs diferentes. Os desenhados neste estudo só reagem com isolados do grupo VCG01213 (TR4) mostrando sua especificidade para esta raça (Figura 3).

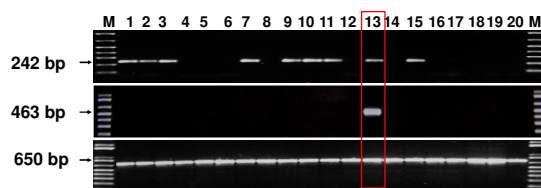


Figura 3. Produtos de PCR de todos os VCGs de Foc usando os primers: Foc-1/Foc-2 (superior), Foc TR4 (meio) e fator de alongação 1 α (inferior). Cada linha corresponde a um VCG diferente. O quadro vermelho destaca o VCG01213 representativo de TR4.

Reações duplex foram desenhadas para evitar falsos negativos tanto para amostras do fungo quanto para plantas. Os controles internos para plantas permitem ademais discriminar genótipos quanto à composição do genoma *accuminata* ou *balbisiana* (Figura 4)

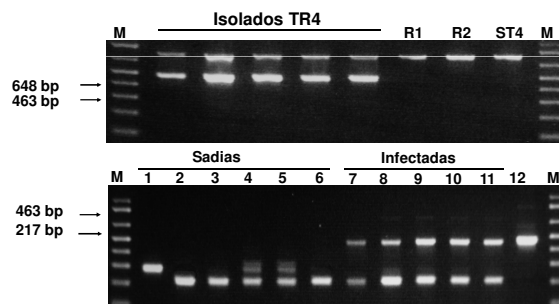


Figura 4. Produtos de PCR duplex usando DNA de Foc (superior) o de banana (inferior). As PCRs duplex com Foc foram realizadas usando os primers para o fator de alongação 1 α como controles internos em combinação com os primers específicos para FocTR4. PCR duplex PCRs com DNA de banana usa primers do gene da actina e os primers específicos para FocTR4. 1- *M. balbisiana* (BB); 2- *M. acuminata* (AA); 3- Grand Naine (planta in vitro); 4- Maça (AAB); 5-Prata Anã (AAB); 6- Rizomas de Grand Naine não inoculadas; 7–9, Rizomas de Grand Naine inoculados com 3 isolados Foc TR4; 10-11-Pseudocaulis infectados de Grand Naine inoculadas com Foc TR4; 12- Controle positivo.

CONCLUSÕES

- Este é o primeiro método de diagnóstico molecular específico para Foc TR4 e permite numa única reação a discriminação do hospedeiro de acordo com a composição do genoma (*accuminata* / *balbisiana*).
- Comparado ao método tradicional de diagnóstico (que demora meses), o método desenvolvido oferece resultados em menos de 24 horas.
- O método servirá como suporte a programas internacionais de quarentena na tomada de decisão sobre transporte de material, medidas de erradicação, bem como em análises de risco de pragas.

REFERENCIAS

1. Dita, M.A. et al. 2010. A molecular diagnostic for tropical race 4 of the banana fusarium wilt pathogen. *Plant Pathology*. 59: 348-357
2. Lin et al.2008. Development of a molecular marker for specific detection of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cabense* *European Journal of Plant pathology*123: 1573-8469