



ESTUDO DE PREVALÊNCIA DO CASSAVA *COMMOM MOSAIC VÍRUS* (CsCMV) E DO CASSAVA *VEIN MOSAIC VIRUS* (CsVMV) NA REGIÃO PRODUTORA DO ESTADO DA BAHIA.

Emanuel Felipe Medeiros Abreu³, Tailan Lemos Fróes¹, Antonio Marcio Fernandes¹, Cícera Maria do Amaral², Francisco Ferraz Laranjeira⁴, Paulo Ernesto Meissner Filho⁴.

¹Estudante de Biomedicina da Faculdade Maria Milza - FAMAM, 44380-000, Cruz das Almas, BA. e-mail: taifroes12@hotmail.com e marciofernandes14@hotmail.com

²Técnica da Embrapa Mandioca e Fruticultura, Caixa Postal 007, 44380-000, Cruz das Almas, BA. E-mail: cicera.amaral@embrapa.br

³Analista da Embrapa Mandioca e Fruticultura, Caixa Postal 007, 44380-000, Cruz das Almas, BA. E-mail: emanuel.abreu@embrapa.br

⁴Pesquisador da Embrapa Mandioca e Fruticultura, Caixa Postal 007, 44380-000, Cruz das Almas, BA. E-mail: francisco.Laranjeira@embrapa.br e paulo.meissner@embrapa.br.

Introdução

A mandioca (*Manihot esculenta Crantz*) é uma das principais fontes de energia na dieta humana dos países tropicais. Por ser propagada vegetativamente, através de partes caulinares (ramas ou manivas) (RODRIGUES et al., 2008), a dispersão de doenças sistêmicas, como as causadas por viroses, podem levar a degenerescência das manivas (COSTA; KITAJIMA, 1972). Em relação aos vírus de maior importância econômica no Brasil, destacam-se o mosaico das nervuras - *Cassava vein mosaic virus* (CsVMV), e o mosaico comum - *Cassava common mosaic virus* CsCMV (CHUMBINHO et al., 2010).

Trabalhos realizados no início da década passada consideram o mosaico das nervuras, CsVMV, como sendo um vírus de ampla abrangência geográfica, sendo prevalente, principalmente, no ecossistema do semi-árido nordestino. Esse efeito não está somente associado às severas manifestações produzidas, mas também pela influência negativa na qualidade dos produtos obtidos (CHIGERU et al., 2003). Além da transmissão por material propagativo, o CsVMV é transmitido por ferramentas utilizadas para o corte das manivas. Observações de campo têm indicado que a manifestação severa da doença em variedades suscetíveis pode causar perdas de produção que variam de 10 a 20%, prejudicando a qualidade do produto, devido à redução de 10 a 50% nos teores de amido (FUKUDA, 1993). Os sintomas caracterizam-se pela presença de cloroses intensas entre as nervuras primárias e secundárias, nas plantas afetadas. Em casos severos da doença é comum observar um forte retorcimento do limbo foliar (OTSUBO et al., 2003).

O CsCMV, mosaico comum, pertencente a família *Flexiviridae* e gênero *Potexvirus* (SOARES et al., 2009), não possui vetor conhecido, logo entende-se que sua disseminação ocorre mecanicamente (COLARICCIO et al., 2009).

O *Cassava common mosaic virus* - CsCMV é classificado como uma *Potexvirus* e possui uma partícula semiflexuosa de 15 nm × 495 nm (Kitajima et al., 1965). O genoma é constituído de uma fita única de RNA senso positiva (ssRNA) de 2 × 10⁶ Da, com capsídeo constituído por uma única proteína de 21 kDa de massa molecular (Nolt et al., 1991). Os sintomas apresentados em mandiocas infectadas por esse vírus são de mosaico no limbo foliar, presença de áreas cloróticas que são muitas vezes limitadas pela as veias e a doença pode causar perdas de rendimento em mais de 30%. Por essa razão, alguns trabalhos apontam para a

importância do cuidado que se deve ter na seleção do material de plantio, pois essas medidas podem ajudar a erradicar ou reduzir a doença a um nível econômico significativamente secundário.

O objetivo do presente trabalho foi detectar, avaliar e identificar a prevalência do CsCMV e do CsVMV em diversas variedades de mandioca cultivadas nas principais regiões produtoras de mandioca do estado da Bahia.

Material e Métodos

O estudo foi conduzido no Laboratório de Virologia da Embrapa Mandioca e Fruticultura, Cruz das Almas – BA. O diagnóstico do CsCMV, foi realizado através do método sorológico (ELISA Indireto), e o CsVMV por teste molecular (PCR) para amplificação do fragmento viral, possibilitando assim, a obtenção de um levantamento da distribuição dos virus acima descrito nas regiões produtoras avaliadas.

Coleta do Material Vegetal: Foram coletadas 465 amostras de folhas jovens de mandioca assintomáticas. Os técnicos envolvidos na coleta selecionaram plantas sem sintomas de viroses e de outras doenças. As folhas foram colhidas em sacos plásticos contendo a seguinte identificação: data e local de coleta, nome da variedade e número da planta matriz.

Teste do ELISA indireto: Foram pesadas 0,2 g de tecido vegetal, onde macerou-se em 500 µL de Tampão Carbonato, do macerado retirou-se 100 µL e sensibilizou-se cada cavidade da placa de poliestireno, a mesma foi mantida em câmara úmida, na geladeira, overnight. No dia seguinte, removeu-se as amostras o lavando a placa três vezes com tampão de lavagem PBS-Tween, tendo intervalos de cinco minutos de uma lavagem para outra. Logo após, adicionou-se a solução bloqueio (leite em pó desnatado) colocando 100 µL em cada cavidade da placa, posterior a mesma foi posta no agitador por uma hora, decorrido o tempo lavou-se a placa três vezes com tampão de lavagem PBS-Tween e adicionou-se 100 µL Solução Anti-soro Especifico CsCMV com uma diluição de 1/6.000). Em seguida, colocou-se novamente em câmara úmida e posta na geladeira em overnight. Na terceira etapa acrescentou-se 100 µL a cada cavidade da placa com a solução do conjugado (Goat Anti-Rabbit IgG com uma diluição de 1/6000). Em sequência, a mesma foi colocada na estufa a 37 °C por quatro horas. Logo após, lavou-se a placa cinco vezes com PBS-Tween, em seguida, adicionou-se 100 µL Tampão Revelador (4-Nitrofenil fosfato, Diltomolamina) nos poços. A avaliação ocorreu através da leitura da absorbância em uma leitora de placas com filtro de 405 nm, e considerou-se positivas as amostras que apresentaram leitura duas vezes superior ao extrato das plantas sadias utilizadas como controle negativo.

Extração do DNA total: A extração do DNA total em que pode ser identificado o DNA do vírus do Mosaico das nervuras (CsVMV) foi obtida a partir de 200 mg de tecido foliar de plantas assintomáticas para a referida virose. O método de extração utilizado foi de acordo com Dellarpota et al. (1983).

Detecção molecular por PCR: O DNA total extraído foi quantificado em gel de agarose 1%, em seguida, as concentrações de DNA das amostras foram ajustadas para 50 ng/ul. Para a reação utilizou-se os primers CsVMV HS F (GAG TGA GTA GTT TCT TAA TTC TTC) e CsVMV HS R (CTA TCA GCT

AAA TTT TCT CTA GC) específicos para detecção do CsVMV. O programa usado para as reações 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 a reação da PCR realizou-se a análise dos fragmentos amplificados com tamanhos de 750 pb através da eletroforese em gel de agarose a 1%.

Resultados e Discussão

As amostras e suas respectivas variedades utilizadas nas avaliações de prevalência foram coletadas nos municípios de Utinga, variedades: Vassourinha e Platina; Cruz das Almas, variedades: Platina, Cigana e Corrente; Bajojo, variedades: Olho Roxo, Formosa e Todo Tempo; Inhambupe, variedades: Lagoão, Cemitério e Cravela; Entre Rios, variedade: Rio Grande; Crisópolis, variedade: Jalé; somando um total de 465 amostras. Dos locais amostrados os dados gerais de prevalência de amostras positivas para o CsVMV e CsCMV foi de 68,2%. Quando comparado à prevalência, o vírus do mosaico comum mostrou-se mais prevalente, com 59,1% das localidades amostradas do que o vírus do mosaico das nervuras, com 27,3% das localidades, de acordo com o teste de comparação de proporções ($P < 0,019$).

A incidência de amostras positivas para o CsCMV foi de 33%, também maior do que para o CsVMV com 7,8%, de acordo com o teste de comparação de proporções, $P < 0,00001$. Estes resultados foram confirmados para cada um dos quatro casos nos quais os vírus estavam presentes nos mesmos locais amostrados. As médias desses casos foram de 36,2% para o CsCMV e 7,5% para o CsVMV, sem diferença em relação à incidência geral.

Não foram encontradas evidências de co-infecção significativa entre os campos amostrados. 26,7% dos campos apresentavam co-infecção, ou seja, quatro campos dentre os que tinham vírus. Considerando o total de campos com vírus, a probabilidade de que quatro tivessem co-infecção aleatória foi de 39,6% (resultados de 1.000.000 amostragens simuladas). Apenas três amostras apresentaram co-infecção dentre as 35 amostras com vírus dos campos que apresentavam co-infecção, revelando um percentual muito baixo. Contudo, por causa da alta correlação entre cidades, variedades e inexistência de informação sobre origem do material, não foi possível fazer análises mais detalhadas.

O referido trabalho pretende ampliar sua base de dados em relação às análises de indexação de amostras coletadas em outras localidades produtoras do estado da Bahia. Essa iniciativa visa conhecer melhor a epidemiologia dessa doença nas principais regiões produtoras de mandioca do Estado e, conseqüentemente, servi de apoio para futuras estratégias de controle e minimização da incidência dessas doenças.

Conclusões

Os estudos preliminares de prevalência revelam que o vírus mais frequente nos campos de mandioca do Estado da Bahia é o *Cassava common mosaic virus*. Entretanto, nos poucos casos em que se observa a presença de infecções mistas o sintoma preponderante é o do *Cassava vein mosaic virus*.

Agradecimentos

Gostaríamos de agradecer a colaboração das instituições EBDA e ADAB e dos colegas da Embrapa Mandioca e Fruticultura, Helton Fleck, Hermínio Rocha, Carlos Estevão e Alberto Vilarinhos.

Referências

- CALVERT, L. A.; THRESH, J. M. The viruses and virus diseases of cassava. In: HILLOCKS, R. J.; THRESH, J. M.; BELLOTTI, A. C. eds. *Cassava: Biology, Production and Utilization*. Wallingford, UK: CAB International, 237–60, 2002.
- CHIGERU, F.; OTSUBO, A. A. Cultivo da mandioca na região centro sul do Brasil. In: Embrapa Mandioca e Fruticultura. *Sistemas de Produção*, v. 7 m ISSN 1678-8796, Jan/2003.
- COLARICCIO, A et al. Primeiro relato do mosaico comum da mandioca em Santa Catarina. In: **XIII CONGRESSO BRASILEIRO DE MANDIOCA**. Botucatu-Sp, 2009.
- COSTA, A. S.; KITAJIMA, E. W. Studies on vírus and mycoplasma diseases of the cassava plant in Brazil. **Proceedings of cassava Mosaic Workshop**, Ibadan. International Institute for Tropical Agriculture. Ibadan, Nigéria, nº 18, 1972.
- FUKUDA, C. Doenças da mandioca. In: EMBRAPA. Centro Nacional de Mandioca e Fruticultura (Cruz das Almas, BA), Instruções práticas para o cultivo de mandioca. Cruz das Almas, p.53-56, 1993.
- LEITE, R.M.V.B.C., MARINGONI, A. C. Principais doenças e seu controle. In: CEREDA, M.P. (coord). **Agricultura: tuberosas amiláceas latino americano**. São Paulo, v.2, cap.22, p.448 – 504, 2002.
- RODRIGUES, A.R.; et al. A Avaliação da Capacidade de Enraizamento, em Água, de Brotações, Ponteiros e Estacas Herbáceas de Clones de Mandioca de Mesa. **Revista Brasileira de Agroambiente**, ed. 2, p.37-45, 2008.
- SOARES, M.B.B. et al. Disseminação do Vírus do Mosaico Comum em área de mandioca (*Manihot esculenta* crantz.). In: **XIII CONGRESSO BRASILEIRO DE MANDIOCA**. Botucatu-SP, 2009.
- OTSUBO, A. A.; CHIGERU, F. Cultivo da mandioca na região centro sul do Brasil. In: Embrapa Mandioca e Fruticultura. *Sistemas de Produção*, v. 7 ISSN 1678-8796, Jan/2003.
- VELAME, K. V. C.; ANDRADE, E. C. de; ALVES, A. A. C.; SANTOS, A. F. dos. Diversidade genética do *Cassava vein mosaic virus*- CSVMV presente no germoplasma de mandioca do semiárido. In: EMBRAPA. Centro Nacional de Mandioca e Fruticultura (Cruz das Almas- BA), Jornada Científica, 2010.