

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS
EMBRAPA MANDIOCA E FRUTICULTURA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA
CURSO DE MESTRADO**

**INCIDÊNCIA E PREVALÊNCIA DAS ESPÉCIES DO *Pineapple
mealybug wilt-associated virus* NO BANCO ATIVO DE
GERMOPLASMA DE ABACAXI DA EMBRAPA MANDIOCA E
FRUTICULTURA E EM NOVE ESTADOS BRASILEIROS**

KEILLA CIDREIRA DOS SANTOS

**CRUZ DAS ALMAS - BAHIA
AGOSTO - 2013**

INCIDÊNCIA E PREVALÊNCIA DAS ESPÉCIES DO *Pineapple mealybug wilt-associated virus* NO BANCO ATIVO DE GERMOPLASMA DE ABACAXI DA EMBRAPA MANDIOCA E FRUTICULTURA E EM EM NOVE ESTADOS BRASILEIROS

KEILLA CIDREIRA DOS SANTOS

Biomédica

FAMAM- Faculdade Maria Milza-2010

Dissertação submetida ao Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia em parceria com a Embrapa Mandioca e Fruticultura, como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre em Microbiologia Agrícola.

Orientador: Eduardo Chumbinho de Andrade

Co-Orientador: Paulo Ernesto Meissner Filho

CRUZ DAS ALMAS – BAHIA

AGOSTO - 2013

FICHA CATALOGRÁFICA

S237	<p>Santos, Keilla Cidreira dos. Incidência e prevalência das espécies do <i>Pineapple mealybug</i> wilt-associated virus no banco ativo de germoplasma de abacaxi da Embrapa Mandioca Fruticultura e em nove Estados Brasileiros / Keilla Cidreira dos Santos. _ Cruz das Almas, BA, 2013. 72f. il.</p> <p>Orientador: Eduardo Chumbinho de Andrade. Coorientador: Paulo Ernesto Meissner Filho.</p> <p>Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas.</p> <p>1.Abacaxi – Doenças. 2.Abacaxi – Doenças – Controle. I.Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas. II.Título.</p> <p>CDD: 634.774</p>
------	---

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS
EMBRAPA MANDIOCA E FRUTICULTURA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA
CURSO DE MESTRADO**

COMISSÃO EXAMINADORA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE

Keilla Cidreira dos Santos

Dr. Paulo Ernesto Meissner Filho
Embrapa Mandioca e Fruticultura
(Co-orientador)

Dr. Davi Theodoro Junghans
Embrapa Mandioca e Fruticultura

Dr. Ricardo Franco Cunha Moreira
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia

CRUZ DAS ALMAS - BAHIA

AGOSTO – 2013

*Para todos os momentos difíceis, Para todos os momentos de dor,
Para todos os momentos de dúvida, Para todos os momentos de angústia,
Para todos os momentos de desespero:
**Lembrar-se de Deus, entregar-se a Deus,
Esperar em Deus e vencer com Deus!**
(Autor desconhecido)*

Dedico a Deus e à minha família.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus por me guiar e iluminar em todos os momentos da minha vida.

À minha família pelos incentivos e apoio.

Ao meu orientador Eduardo Chumbinho, pela orientação, compreensão e dedicação.

À Dr. Fernanda Vidigal, um anjo que Deus colocou no meu caminho, para me ajudar e poder tornar possível a realização dessa dissertação.

A Dr. Carlos Ledo, por sua importante contribuição nas análises estatísticas.

A Dr. Paulo pela disponibilidade, compreensão e tranquilidade em todos os momentos.

A todos os colegas do Laboratório de Virologia, pelo apoio, incentivo e disponibilidade em ajudar sempre que necessário.

A todos os amigos e colegas do mestrado, que de alguma forma contribuíram para a realização desta nova etapa da minha vida.

Muito obrigada a todos!

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

INTRODUÇÃO GERAL.....1

CAPÍTULO 1 – PREVALÊNCIA DO *Pineapple mealybug wilt-associated virus*, (PMWaV), NO BANCO ATIVO DE GERMOPLASMA DE ABACAXI DA EMBRAPA MANDIOCA E FRUTICULTURA24

RESUMO 25

ABSTRACT 26

INTRODUÇÃO 27

MATERIAL E MÉTODOS..... 29

RESULTADOS e DISCUSSÃO..... 37

REFERÊNCIAS..... 43

CAPÍTULO 2 - PREVALÊNCIA DO *Pineapple mealybug wilt-associated virus*, (PMWaV), EM NOVE ESTADOS BRASILEIROS.....45

RESUMO 46

ABSTRACT 47

INTRODUÇÃO 46

MATERIAL E MÉTODOS..... 50

RESULTADOS E DISCUSSÃO: 55

CONSIDERAÇÕES FINAIS.....61

REFERÊNCIAS	62
FIRST REPORT	65

RESUMO

Santos, K.C. Incidência e prevalência das espécies de *Pineapple mealybug wilt-associated virus* no banco ativo de germoplasma de abacaxi da Embrapa Mandioca e Fruticultura e em nove estados brasileiros.

O Brasil é o mais importante centro de origem e diversidade do abacaxi (*Ananas comosus* (L) Merr.) e concentra em seu território a maior variabilidade genética do gênero. A fruta é uma das mais apreciadas no mundo e amplamente cultivada no país. O *Pineapple mealybug wilt-associated virus* (PMWaV) é um vírus que infecta o abacaxi e causa a doença denominada “Murça do abacaxi”. O vírus é transmitido pelas cochonilhas *Dysmicoccus brevipes* e *D. neobrevipes*. O PMWaV pertence à família *Closteroviridae*, gênero *Ampelovirus*, possui partícula alongada flexuosa e genoma de RNA fita simples. Atualmente, acredita-se que a doença seja causada por um complexo de três espécies, PMWaV-1, PMWaV-2 e PMWaV-3, que se diferenciam pela sequência e organização do genoma. Além dos danos diretos que a doença pode causar no cultivo, a infecção de variedades silvestres não cultivadas e conservadas no Banco Ativo de Germoplasma (BAG) tem sido um registro preocupante. Além disso, existe uma ausência de informações relacionadas à prevalência das espécies nas áreas de produção comercial. Diante disto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a incidência do PMWaV-1, 2, 3 nos acessos do BAG da Embrapa Mandioca e Fruticultura e em plantios de abacaxi de nove estados brasileiros. Os resultados demonstraram que o vírus está presente em todas as variedades de *A. comosus* e *A. macrodontes*. O PMWaV não se restringiu ao gênero *Ananas*, pois foi detectado em diferentes espécies de bromélias. A ocorrência dos PMWaVs em diferentes espécies de bromélias, se configura um fato inédito e deverá abrir espaço para discussão do seu papel como fonte de disseminação do vírus. Nas amostras coletadas em regiões produtoras houve predominância do PMWaV-2, embora em duas amostras sintomáticas foi detectado apenas o PMWaV-1. A comparação entre sequências obtidas mostra elevada conservação apenas entre isolados da mesma espécie. A frequência de plantas com infecção mista foi elevada em ambos os levantamentos realizados.

Palavras-chave: *Ampelovirus*, murça, PMWaV

ABSTRACT

Santos, K.C. Incidence and prevalence of *Pineapple mealybug wilt-associated virus* species, in the active germplasm bank of Embrapa Cassava and Fruits and in nine Brazilian states.

Brazil is the most important center of origin and diversity of pineapple (*Ananas comosus* (L) Merr.) with the greatest genetic variability from genera concentrated in its territory. The fruit is one of the most appreciated in the world and widely cultivated in the country. The *Pineapple mealybug wilt-associated virus* (PMWaV) is a virus that infects the pineapple causing disease popularly named Mealybug Wilt of Pineapple (MWP). The virus is transmitted by the mealybugs *Dysmicoccus brevipes* and *D. neobrevipes*. The PMWaV belongs to the family *Closteroviridae*, genus *Ampelovirus*, has elongated flexuous particles and positive single strand RNA genome. Currently, it is believed that the disease is caused by a complex of three virus species, PMWaV-1, PMWaV-2 and PMWaV-3, that differ in the sequence and genome organization. Besides to the direct damage in the plant production, the contamination of wild uncultivated varieties in the Active Germplasm Bank (AGB) at Embrapa Cassava and Fruits is concerning. In addition, there is an absence of information regarding the prevalence of the species in Pineapple commercial field. Hence, the objective of this study was to evaluate the incidence of PMWaV-1, 2,3 in accessions of BAG from Embrapa Cassava and Fruits and nine Brazilian states. The results showed that the virus is present in all varieties of *A. comosus* and *A. macrodontes*. The PMWaV was not restricted to the genus *Ananas*, since they were detected in different species of bromeliads. The occurrence of PMWaV in different species of bromeliads is unprecedented and should open space for discussion in relation to its role as a source of spreading the virus. In the commercial pineapple fields samples collected, the predominance was PMWaV-2, although in two symptomatic samples, only PMWaV-1 was detected. Comparison of sequences obtained showed high conservation only among isolates of the same species. The frequency of plants with mixed infection was high in both surveys.

Keywords: *Ampelovirus*, withered, PMWaV

INTRODUÇÃO GERAL

O abacaxizeiro (*Ananas comosus* (L) Merr.) é a espécie mais importante economicamente e mais amplamente cultivada da família *Bromeliaceae* (SOUZA et al., 2011). O Brasil é considerado um dos principais centros de diversidade genética do abacaxi porque, além de *Ananas comosus* var. *comosus* e de *A. macrodontes*, todas as demais variedades botânicas, são encontradas nas formas silvestres, ou cultivadas em várias regiões brasileiras (FERREIRA e CABRAL, 1993).

A planta possui outros usos além da alimentação, como a produção de fibras para indústria automotiva (LEÃO et al., 2009), para a fabricação de papel (MARQUES et al., 2007), produção de enzimas de ação proteolítica e metabólitos secundários com ação antioxidante (BENNETT, 2000; ROSSI e TAMBOURGI, 2005; MANETTI et al., 2009), além do seu uso como planta ornamental (SANEWSKI, 2009; SOUZA et al., 2011).

A infrutescência apresenta grande valor nutritivo, com destaque para a alta composição de açúcares, sais minerais como cálcio, fósforo, magnésio, potássio, sódio, cobre e ferro, além de vitaminas (C, A, B1, B2 e niacina) e baixo teor de gorduras (FRANCO, 1989; GONDIM et al., 2005). Também é caracterizado pela bromelina, nome dado ao conjunto de enzimas proteolíticas muito utilizadas na composição de medicamentos, por possuir propriedades que auxiliam no tratamento de distúrbios digestivos, feridas, inflamações e como expectorante. Além disso, é utilizada na indústria alimentícia e na produção de detergentes (FRANÇA-SANTOS et al., 2009). As folhas do abacaxi *Ananas comosus* se mostraram eficientes como antioxidantes e no tratamento para o diabetes e diminuição do colesterol (XIE et al., 2005; XIE et al., 2006)

O abacaxi é a sexta fruteira tropical mais explorada economicamente no mundo, com uma produção de 21,5 milhões de toneladas em 2011. O Brasil é o maior produtor, seguido pela Tailândia e em terceiro lugar pelas Filipinas (FAO, 2011). A produção brasileira de abacaxi é crescente e em 2011 chegou a 1,57 milhões de frutos em uma área de 62.481 hectares (IBGE, 2011). Apesar disso, a produtividade média brasileira ainda é considerada baixa, com

média de 25 t/ha, enquanto que alguns países possuem uma produtividade acima de 50 t/ha. Práticas culturais inadequadas, fatores ambientais adversos, problemas fitossanitários, dentre outros, contribuem para a baixa produtividade da abacaxicultura nacional (SOUZA et al., 2000).

Em nível mundial, a infecção causada pelo vírus associado à murcha do abacaxi (*Pineapple mealybug wilt-associated virus*, PMWaV), transmitido pela cochonilha *Dysmicoccus brevipes* e *Dysmicoccus neobrevipes*, se constitui em um dos maiores problemas da cultura. A planta infectada geralmente possui menor porte, apresenta folhas avermelhadas com pontas secas, poucas raízes, e são retiradas do solo com facilidade (CARTER, 1933; VELAME et al., 2004). A doença acarreta a perda de turgescência dos tecidos foliares e partes suculentas do abacaxizeiro, fazendo-o definhar progressivamente, podendo levá-lo à morte.

O PMWaV pertence à família *Closteroviridae*, gênero *Ampelovirus*, possui partícula alongada flexuosa e genoma de RNA fita simples com aproximadamente 14 kb. Atualmente, acredita-se que a doença seja causada por um complexo viral, pois já foram caracterizados três espécies do PMWaV, denominados PMWaV-1, PMWaV-2, e PMWaV-3, que se diferenciam pela sequência e organização do genoma (MELZER et al., 2001; MELZER et al., 2008; SETHER et al., 2009). A literatura também cita a existência de mais dois vírus, o PMWaV-4 e PMWaV-5, que ainda não tiveram seus genomas completamente sequenciados (SETHETTER et al., 2005 b; GAMBLEY et al., 2008).

A murcha está presente nas principais regiões produtoras de abacaxi do mundo (WAKMAN et al., 1995; HU et al., 1996; BORROTO et al., 1998) No Brasil, a doença tem aumentado consideravelmente nos últimos anos, causando em média perdas acima de 30% nos estados produtores como o Espírito Santo, Paraíba e Bahia, chegando em alguns casos, a perdas de 70 a 90% (SANCHES e DIAMANTINO, 1997; VENTURA e ZAMBOLIM, 2002). No Havaí houve uma redução no peso médio dos frutos de 30 a 55%, a redução do peso do fruto, conseqüentemente da produtividade, foi maior quanto mais cedo ocorreu a infecção com a murcha (SETHETTER e HU, 2002 b).

A propagação do abacaxizeiro é predominantemente assexuada por meio de mudas a partir de brotações laterais da planta (tipos filhote e rebentão), já que a coroa acompanha o fruto no momento da comercialização. Nesse tipo de

propagação as mudas são potenciais vetores de pragas e doenças, o que compromete os novos plantios, assim como limita uma alta taxa de propagação. Essa situação se estabelece, principalmente, quando plantas assintomáticas são utilizadas para a produção de mudas. Mudas oriundas de plantas infectadas é a principal forma de disseminação da doença para novas áreas (VENTURA e ZAMBOLIM, 2002).

Como o abacaxi, as bromélias também pertencem à família *Bromeliaceae* e podem ser encontradas em diferentes habitats, por se adaptarem facilmente aos ambientes em que são cultivadas (COSTA e FONTOURA, 1989). São plantas típicas das zonas tropicais e subtropical das Américas e são encontradas tanto ao nível do mar, quanto em altitudes acima de 4.000 metros, em zonas de elevada precipitação ou em regiões semiáridas e até desérticas (LEME, 1984). No Brasil, elas são encontradas em praticamente todas as regiões, com maior diversidade na Mata Atlântica, situada entre os estados de Santa Catarina e Bahia (PAULA, 2000).

Por pertencerem a mesma família, é possível que bromélias também possam ser hospedeiras do PMWaV, ainda que até o momento, não existam registros que descrevam a detecção de PMWaV em bromélias. É importante determinar se elas podem representar uma fonte de disseminação do vírus, o que implica no estabelecimento de regulação em seu comércio, similar ao que ocorre para outras plantas, como batata, banana e o próprio abacaxi.

O Banco Ativo de Germoplasma de Abacaxizeiros da Embrapa Mandioca e Fruticultura (BAG Abacaxi) é o maior do mundo e foi estabelecido há quase três décadas mediante a realização de coleta e intercâmbio de germoplasma em nível nacional e internacional e conta atualmente com 630 acessos (MACHADO et al., 2009). Levantamentos preliminares da ocorrência do PMWaV no Banco Ativo de Germoplasma de Abacaxi mostraram a presença do vírus em 91% dos acessos sintomáticos avaliados (SANTOS et al., 2002). Entretanto, passados 13 anos, a análise visual dos acessos evidencia um avanço significativo na incidência do PMWaV no BAG, o que justifica nova avaliação dos acessos infectados, bem como a frequência das espécies de PMWaV. Informações desta natureza poderão ajudar no direcionamento de acessos para um programa de limpeza clonal, bem como indicar acessos que permanecem sadios, apesar do estabelecimento constante

próximo a outros infectados, o que pode indicar algum tipo de resistência, seja ao vírus ou vetor.

O BAG Abacaxi, abriga também diversas espécies de bromélias, que são mantidas próximas a abacaxizeiros com sintomas de murcha, desta forma expostas à infecção pelo PMWaV. Estas plantas são, portanto, importantes fontes de informação quanto à susceptibilidade de bromélias ao PMWaV.

Diante da necessidade de informações quanto ao papel das bromélias na disseminação do vírus, bem como a distribuição do PMWaV nos acessos de abacaxi, este trabalho se propôs estudar a prevalência das espécies do PMWaV em acessos do BAG, tanto do gênero *Ananas* quanto de bromélias. Além disso, este trabalho traz um panorama sobre a presença das espécies do PMWaV em regiões produtoras brasileiras.

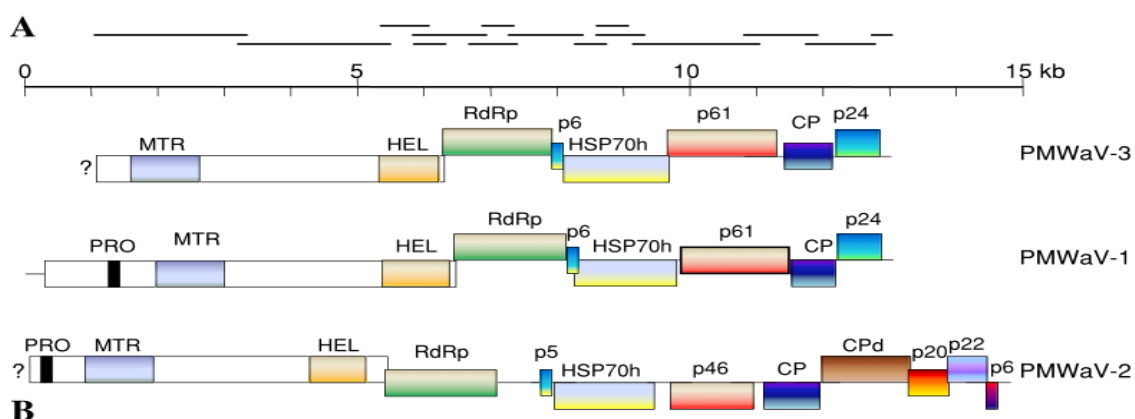


Figura 1: Organização do genoma dos PMWaV-1, PMWaV-2 e PMWaV-3 , retirado do artigo de Sether et al. (2009). ORF1a: MTR- Metiltransferase; HEL- Helicase; ORF1b: RdRp- RNA dependente de RNA polimerase; ORF2: Pequena proteína hidrofóbica; ORF3 : Hsp 70 (Heat shock protein 70); ORF4: Proteínas p61 ou p46; ORF5: CP- Capa Protéica; ORF6: p24 ou CPd- Capa Proteica duplicada; ORF7: p20; ORF8: p22; ORF9: p6.

REVISÃO DE LITERATURA

Origem do abacaxi

O abacaxi originou-se da América tropical e subtropical, correspondendo às regiões sul, sudeste e centro-oeste do Brasil, norte da Argentina e Paraguai (COLLINS, 1992). Pelo fato de existir uma grande diversidade de gêneros, há relatos na literatura, que o centro de origem pode ter sido o Brasil Central (SIMÃO, 1998; CTENAS e QUAST, 2000), enquanto outros autores acreditam que a planta tenha se originado no Paraguai, onde se disseminou para outras regiões do mundo (COPPENS D'EECKENBRUGGE e LEAL, 2003).

A literatura relata que o abacaxi já era cultivado pelos indígenas em extensas regiões do novo mundo, antes do descobrimento, inclusive no Brasil e América Central (SIMÃO, 1998). Os índios sul-americanos reconheceram a fruta como comestível e começaram a domesticá-la por volta de 4.000 a.C. (HAYS & HAYS, 1973). E de acordo com CTENAS & QUAST (2000), o abacaxi foi propagado naturalmente até a América Central e disseminado no mundo pelos portugueses, durante as grandes navegações. Foi levado para a Europa, para demonstrar o quanto as terras descobertas, eram dotadas de belezas inigualáveis e exóticas (SILVA e TASSARA, 2001) e como teve uma boa aceitação pelos europeus, os frutos começaram a ser produzidos na Holanda.

Abacaxi - características gerais

O abacaxizeiro é uma planta monocotiledônea, herbácea duradoura e pertence à família *Bromeliaceae* e gênero *Ananas*. Esse gênero é vastamente distribuído nas regiões tropicais por intermédio da espécie *Ananas comosus* var. *comosus*, que abrange todas as cultivares plantadas de abacaxi para uso alimentar. O fruto do abacaxizeiro é caracterizado por um aglomerado de uma ou duas centenas de pequenos frutos (frutinhos ou gomos) em torno de um mesmo eixo central, em que cada “olho” da casca do abacaxi é um fruto verdadeiro que cresceu a partir de uma flor, e estes se fundem em um grande

corpo, chamado infrutescência, no topo do qual se forma a coroa (SILVA e TASSARA, 2001).

É uma planta de clima tropical e apresenta ótimo crescimento e melhor qualidade do fruto com temperatura variável entre 22 °C e 32 °C. A amplitude térmica, entre dia e noite tem que variar de 8 °C e 14 °C. Consegue se desenvolver em locais com alta incidência de radiação solar. Por não tolerar sombreamento, a insolação anual ótima é de 6,8 h a 8, 2 horas por dia de brilho solar e chuvas de 1.200 e 1.500 (CUNHA, 1999). Possui muitas características que lhe permitem se adaptar ao clima seco, mas para obter frutos de maior qualidade, a cultura tem que ser suprida com água. A umidade relativa média anual do ar deve ser de 70%, já que períodos com umidade inferior a 50% podem causar fendilhamento e rachaduras nos frutos durante a fase de maturação (REINHARDT et al., 2000).

A propagação do abacaxi é feita vegetativamente, podendo ser utilizadas diversas estruturas da planta adulta, tais como o rebentão, haste, filhote-rebentão e também a coroa (SIMÃO, 1998). Também pode ser realizada por meio do seccionamento do caule (CUNHA e REINHARDT, 2004), da destruição do meristema apical (HEENKENDA, 1993) ou pela indução do crescimento, utilizando substâncias reguladoras (GUERRA et al., 1999). O uso da micropropagação é uma alternativa para a produção de mudas, ainda que cuidados sejam necessários para evitar a produção de plantas com alterações genéticas (SOUZA et al., 2009).

Variedades e cultivares

Ananas comosus var. *comosus* inclui todas as cultivares de abacaxi de interesse na fruticultura. Entretanto, variedades de *Ananas comosus* var. *erectifolius*, var. *ananassoides* e var. *bracteatus*, são cultivadas para fins ornamentais ou para produção de fibra (SOUZA et al., 2011). A fruticultura brasileira é constituída predominantemente pelas cultivares Pérola e Smooth Cayenne (CABRAL et al., 2003).

A cultivar Smooth Cayenne é caracterizada por ser uma planta de porte baixo, folhas verde-escuro com aproximadamente 1m de comprimento e fruto

grande e cilíndrico. Esta cultivar diferencia-se das demais por apresentar folhas praticamente sem espinhos, sendo considerada a mais adequada para a industrialização. Entretanto, é muito suscetível ao vírus que causa a murcha do abacaxi e a fusariose (*Fusarium guttiforme*) (CABRAL et al., 2000; VAILLANT et al., 2001).

A cultivar Pérola, amplamente cultivada no Brasil, é uma planta de crescimento ereto, apresenta folhas com 65 cm de comprimento, sendo o fruto cilíndrico com cor verde amarelada. A polpa é suculenta, amarelo-pálida ou branca e possui baixa acidez, sendo pouco adequado para comercialização no mercado externo, mas agradável ao paladar do brasileiro, sendo a mais aceita no mercado interno (VAILLANT et al., 2001).

Aspectos econômicos da cultura

Cerca de 70% da produção mundial de abacaxi é destinada ao consumo como fruto fresco no país de origem, enquanto o restante da produção se destina ao comércio internacional, principalmente com produtos processados como fatias enlatadas, pedaços frescos e congelados, suco natural e suco concentrado (ROHRBACH et al., 2003). A planta possui várias utilidades tais como, ornamentação e arquitetura. Seu caule pode ser utilizado como matéria-prima na obtenção do álcool etílico e na indústria de alimentos. O restante do abacaxizeiro pode ser aproveitado na alimentação animal (MEDINA et al., 1987).

A abacaxicultura está presente em praticamente todos os estados brasileiros. Até 1970, a produtividade não era muito expressiva. Nesta época a produção nacional do abacaxi foi de 282.000 frutos, com rendimento de aproximadamente 8.000 frutos por hectares. Na década de 1990, a abacaxicultura experimentou um alto crescimento, tanto na área plantada como no volume produzido. O cultivo começou a se expandir para regiões que antes não se caracterizavam como grandes produtores, como os estados do Pará e Paraíba (SOUZA e SOUZA, 2000). Em 2011, a produção atingiu mais de 1.576.000 frutos em uma área de 62.481 hectares com um rendimento médio de 25.239 frutos por hectares. Estes resultados demonstram um crescimento

expressivo tanto na produção quanto no rendimento do abacaxizeiro no Brasil (IBGE, 2011).

Segundo IBGE (2011), os principais produtores de abacaxi, em ordem decrescente foram à Paraíba, Pará, Minas Gerais e Bahia, que juntos corresponderam a 58,07 % da produção nacional. Considerando as regiões fisiográficas, as maiores produções ocorreram na região Nordeste, que se destacou por produzir mais de 610.000 frutos, tendo uma participação na produção total do país de 38,73%. Em segundo lugar esteve a região sudeste, com mais de 404.000 frutos, totalizando 28,67 % da produção total e em terceiro lugar a região Norte, com mais de 393.000 frutos produzidos e participação na produção de 24,95%.

O Brasil é um dos maiores produtores mundiais, junto com Tailândia, Costa Rica, Filipinas, China, Indonésia e Índia (FAO, 2011). Todavia, a produtividade nacional é considerada baixa, cerca de 25 t/ha se comparada a outros países produtores, acima de 50 t/ha (SOUZA et al., 2000).

Além da sua importância econômica, a cultura do abacaxi merece destaque na geração de renda no campo, pois necessita de mão-de-obra constante, o que contribui para a geração de empregos no meio rural. A expansão de seu cultivo em função do aumento da abacaxicultura irrigada contribuiu muito para a elevação do emprego nestas regiões, que utilizam a mão-de-obra em indústrias de beneficiamento e transformação dos produtos do abacaxi, tanto para o mercado interno como para exportação (SOUZA e SOUZA, 2000).

Bromélias

A família *Bromeliaceae* compreende aproximadamente 60 gêneros e 3170 espécies, sendo que 70% dos gêneros e 40% das espécies ocorrem no Brasil. Atualmente estão subdivididas em oito subfamílias, que são: *Brocchinioideae*, *Lindmanioideae*, *Tillandsioideae*, *Hectioideae*, *Navioideae*, *Pitcaimioideae*, *Puyoideae*, *Bromelioideae* (PAULA, 2000). Em sua maioria, esta família reúne plantas herbáceas, perenes, terrestres, epífitas ou rupícolas, com caule reduzido, portadoras de folhas longas dispostas em rosetas e densamente sobrepostas na base (WANDERLEY e MARTINS, 2007). As bromélias

possuem na superfície da folha, tricomas, chamadas escamas peltadas ou foliares, que conferem a essas plantas, capacidade singular de absorção de água e nutrientes, até mesmo do ar (PAULA, 2000).

Essas plantas possuem várias utilidades, tais como utilização das fibras lignocelulósicas em indústria automobilística e artesanato. A espécie *Tillandsia usneoides* é largamente utilizada como medicamento e outras espécies como a *Bromelia balansae* tem uso como cerca viva (PAULA e SILVA, 2004). Entretanto, seu principal uso é como planta ornamental com finalidade comercial (RODRIGUES et al., 2004).

Grande parte das doenças em bromélias ocorre, logo após o nascimento da nova muda, período em que elas estão mais frágeis. Muitas são provocadas por fungos. Também é atacada por insetos, pragas como pulgões, formigas, lesmas, besouros e cochonilhas que, na maioria das vezes, se não for controladas, podem causar danos significativos (PAULA, 2000; PAULA e SILVA, 2004). Até o momento não havia relatos da presença do PMWaV em espécies de bromélias.

A murcha do abacaxizeiro – etiologia

A murcha do abacaxizeiro foi descrita pela primeira vez no Havaí em 1900. Inicialmente, pesquisadores acreditavam que toxinas produzidas e injetadas por cochonilhas que colonizavam a planta, causavam os sintomas no abacaxizeiro (CARTER, 1933). Entretanto, posteriormente constatou-se que plantas saudáveis, quando colonizadas pelas cochonilhas, não apresentavam quaisquer sintomas da doença, derrubando a hipótese de toxinas liberadas pelo inseto, estarem causando a murcha do abacaxi (SINGH e SASTRY, 1974). Ao inocular plantas de abacaxi com cochonilhas, provenientes de plantas doentes, estas apresentavam sintomas 60 dias após a inoculação. Entretanto, quando inocularam plantas com cochonilhas provenientes de uma colônia mantida em condições controladas não houve o aparecimento de sintomas, indicando a presença de um segundo agente envolvido na doença (SINGH e SASTRY, 1974).

Na década de 80 foi observada a presença de partículas virais em plantas sintomáticas (MARAMOROSCH et al., 1984; GUANASINGHE e GERMAM, 1987, 1989). Esta constatação levou a posterior identificação de um vírus a partir de abacaxizeiros com sintomas de murcha, com indicativo de uma etiologia viral para a doença (GUANASINGHE e GERMAN 1987 e 1989; ULLMAN et al., 1989, 1991). O vírus associado à murcha do abacaxi foi denominado PMWaV, *Pineapple mealybug wilt-associated virus* (PMWaV) (MAYO, 2002).

A doença é causada por um complexo viral, tendo sido caracterizados o PMWaV-1, PMWaV-2 e PMWaV-3, que se diferenciam pela sequência e organização do genoma (SETHER et al., 2001, MELZER et al., 2008; SETHER et al., 2009). O PMWaV pertence à família *Closteroviridae* que compreende vírus de plantas com genoma de RNA de fita simples, partículas filamentosas e transmissão semi-persistente por insetos. Três gêneros são definidos nessa família, o *Closterovirus*, *Ampelovirus* e o *Crinivirus*, que possuem como vetores afídeos, cochonilhas e moscas-branas, respectivamente. O PMWaV pertence ao gênero *Ampelovirus* (KARASEV, 2000; MARTELLI et al., 2002).

A atual classificação da família *Closteroviridae* em três gêneros, foi definida primeiramente pelo tipo de inseto vetor e depois pelo número de RNAs genômicos. Anteriormente, a família era dividida em *Closterovirus* e *Crinivirus*, cuja principal diferenciação era a propriedade dos genomas monopartidos ou bipartidos, respectivamente (MARTELLI et al., 2002). Posteriormente, foi realizada uma nova revisão da família *Closteroviridae*, por conta de novas informações moleculares. Em particular as espécies transmitidas pelas cochonilhas, foram separadas do *Closterovirus* e acomodadas em outro gênero, nomeado *Ampelovirus* (MARTELLI et al., 2002).

Apesar de possuírem características biológicas similares, análises genômicas comparativas entre PMWaV-1 e PMWaV-2 mostraram que os dois vírus são bem diferentes (MELZER et al., 2001, 2008). Entretanto, quando comparados o PMWaV-1 e PMWaV-3 apresentam elevada similaridade na sequência de aminoácidos de algumas proteínas, o que não é observado entre o PMWaV-3 e o PMWaV-2 (SETHER et al., 2009).

Ao inocular plantas isoladamente com cada uma das espécies de PMWaV, verificou-se que apenas as que estavam infectadas com o PMWaV-2

apresentavam sintomas de murcha (SETHER et al. 2002). Além disso, foi observado que apenas as plantas infectadas com o PMWaV-2 e que estavam colonizadas pela cochonilha, apresentavam os sintomas, confirmando que a cochonilha é parte integrante da etiologia da doença (SETHER e HU, 2002 b).

A cochonilha do abacaxi, *Dysmicoccus brevipes* e *D. neobrevipes* (Hemiptera: Pseudococcidae), também conhecida como cochonilha pulverulenta do abacaxi, cochonilha farinhosa ou piolho farinhento, é uma praga que além de ter um papel importante na murcha, também provoca sérios danos à abacaxicultura em decorrência do seu parasitismo (BEARDSLEY, 1959).

Trata-se de um inseto de fácil reconhecimento: a fêmea alcança aproximadamente 3 mm de comprimento, tem forma oval-alongada, é recoberta por uma secreção cerosa branca, lembrando o formato de uma bolota de algodão. Sem essa camada de cera branca, ela tem uma cor rosa. A *D. brevipes* é normalmente encontrada nas partes mais baixas do abacaxizeiro, perto ou abaixo do nível do solo, nas raízes, enquanto *D. neobrevipes*, frequentemente, se localiza na coroa e nos frutos em desenvolvimento (BEARDSLEY, 1959). Além do abacaxizeiro, coloniza mais de 30 plantas hospedeiras, a exemplo de arroz, batatinha, algodoeiro, bananeira, milho, soja, cana de açúcar, amendoim, café, coco, jabuticaba, sorgo, bambu, sapé e tiririca (dandá) (SANCHES et al., 2000). As áreas de plantios com abacaxizeiros são atacadas pela cochonilha a partir do material de plantio ou ainda em decorrência do deslocamento desse inseto das raízes das gramíneas e de outras plantas hospedeiras que crescem às margens da cultura. É uma praga que ocorre durante todo o ciclo da cultura, com maior intensidade de infestação nos períodos quentes e úmidos, mais favoráveis ao desenvolvimento deste inseto.

Os sintomas causados pelo PMWaV, ocorrem inicialmente nas raízes (secamento e morte), com posterior murchamento e descoloração gradual das folhas (avermelhamento, seguido de amarelecimento). A seguir, os bordos das folhas dobram-se para baixo e posteriormente, as folhas curvam-se em direção ao solo, perdem a turgescência e suas pontas ficam secas (morte descendente ou "Die Back") (ROHRBACH et al., 1988; GERMAN et al., 1992)

Outro componente importante do complexo da murcha do abacaxizeiro são as formigas doceiras, dos gêneros *Pheidole* e *Solenopsis*, que vivem em simbiose por protocooperação com as cochonilhas. As formigas se alimentam da secreção açucarada produzida pelas cochonilhas. Em troca, protegem as colônias das intempéries e dos inimigos naturais, com uma cobertura de restos orgânicos. Atuam também como agentes de dispersão na cultura, pelo transporte das formas jovens da cochonilha dos hospedeiros nativos e dos restos de culturas, para os novos plantios (SANCHES e MATOS, 1999). O deslocamento das cochonilhas é sensivelmente menor na ausência das formigas, conseqüentemente a disseminação da doença será menor (JAHN et al., 2003).

A murcha do abacaxizeiro – Princípios de controle de doenças em plantas

O uso de tratamento térmico é uma alternativa para a obtenção de material propagativo livre de vírus. O tratamento de mudas a 50°C por 30 minutos permitiu obter 100% de sobrevivência das mudas e 100% das plantas livres do vírus. Essas plantas foram indexadas por ELISA e mantidas em observação em casa de vegetação por mais de 18 meses, sem detecção de sintomas ou a presença do vírus (ULLMAN et al., 1991).

Outra alternativa é a limpeza por cultura de tecidos. Sether et al. (2001) obtiveram mudas livres de vírus a partir da multiplicação *in vitro* de gemas axilares ou apicais de plantas infectadas. Cerca de 92% das mudas provenientes de gemas com 1 mm² ou inferior, apresentavam-se livres do vírus (SETHETTER et al., 2001).

O controle da murcha deve contemplar, obrigatoriamente, ações de exclusão do vírus da área de plantio, com a finalidade de evitar sua introdução. A principal medida é o uso de mudas livres de vírus. A seleção visual de mudas é uma alternativa de baixo custo para o produtor rural. Entretanto, esse é um procedimento de risco, já que em algumas situações, plantas infectadas com o vírus não apresentam sintomas.

Detectado a presença de plantas doentes na área de plantio, ações visando à redução da disseminação da doença devem ser adotadas. A

primeira medida é a erradicação das plantas com sintomas. Normalmente, as plantas infectadas com murcha apresentam uma distribuição em reboleiras. As plantas arrancadas devem ser removidas do local e queimadas. Além disso, as plantas localizadas ao redor do foco devem ser pulverizadas com inseticidas para o controle da cochonilha (CECÍLIA e ROSSI, 1991), tais como o paration (CARTER, 1956), malation e diazinom (FERNANDO, 1956), dissulfotom (NOKANO e PARRA, 1967), aldicarbe, carbefuram e acefato (MENEZES, 1977), vamidotom, dimeloato e aldicarbe (SANCHES, 1986).

Outra medida importante é a remoção de plantas hospedeiras, alternativas presentes ao redor do plantio, pois podem servir de abrigo para a cochonilha. Devido à relação existente entre cochonilhas e formigas, e o impacto resultante da proteção e dispersão da cochonilha na disseminação da doença, o controle das formigas torna-se prática essencial no manejo da murcha do abacaxizeiro (JAHN et al., 2003).

Todas as estratégias para obtenção de mudas sadias devem ser posteriormente seguidas da etapa de indexação do material vegetal. Atualmente, as técnicas mais utilizadas para detecção de vírus em abacaxi são as sorológicas e moleculares. As sorológicas utilizam anticorpos marcados que têm a capacidade de detectar a partícula ou proteínas virais no extrato vegetal, ao passo que as moleculares detectam a presença do ácido nucléico viral. Para indexação é necessário um método rápido, barato, sensível e prático. Os métodos moleculares de detecção apresentam maior sensibilidade, porém possuem maior custo, principalmente quando se necessita detectar vírus com genoma de RNA, que é o caso do PMWaV.

Embora exista no mercado dois antissoros para a detecção do PMWaV, a técnica sorológica empregada, denominada *Tissue Blotting Immunoassay* (TBIA), possui características que dificultam seu uso rotineiro para a análise de um grande número de amostras (HU et al., 1997).

A técnica molecular utilizada para a detecção do PMWaV é a RT-PCR (Reação em cadeia da polimerase com transcrição reversa), que se baseia inicialmente na utilização do RNA viral como molde para a síntese de uma cópia DNA complementar (cDNA) com auxílio da enzima transcriptase reversa, seguido de uma reação de PCR. Já existem oligonucleotídeos específicos capazes de detectar o PMWaV-1, PMWaV-2 e PMWaV-3 (SETHUR et al.,

2005). Recentemente foram detectadas mais duas espécies virais, o PMWaV-4 e PMWaV-5, que ainda não foram sequenciados completamente (Sether et al. 2005b ; Gambley, 2008). Entretanto, para cada espécie de vírus a ser analisada, é necessária a realização de uma reação de PCR. Visando reduzir o número de reações de RT-PCR e gerar economia de tempo e custo, Andrade et al. (2010), desenharam oligonucleotídeos degenerados, que foram capazes de detectar simultaneamente as três espécies virais.

REFERÊNCIAS

- ANDRADE, E. C.; SANTOS, K. C.; MEISNER, P. E. Development of degenerated primers to detect different viruses associated with mealybug wilt of pineapple. **Pineapple News**, n. 17, p. 8, 2010.
- BENNETT, B. C. Ethnobotany of Bromeliaceae. In: BENZING, D. H. (Ed.). **Bromeliaceae: profile of an adaptative radiation**. Cambridge: University: Cambridge, 2000.
- BEARDSLEY, J.W. On the taxonomy of pineapple mealybugs in Hawaii, with description of a previously unnamed species (Homoptera: Pseudococcidae). **Entomol. Soc.**, Hawaii, v. 17, p. 29–37, 1959.
- BORROTO, E. G., CINTRA, M., GONZALEZ, J., BORROTO, C.; ORAMAS, P. First report of closterovirus-like particle associated with pineapple plants (*Ananas comosus* cv. Smooth Cayenne) affected with pineapple mealybug wilt in Cuba. **Plant Disease**, Cuba, v.82, p. 263, 1998.
- CABRAL, J. R. S. Variedades. In: REINHARDT, D. H.; SOUZA, L. S. F.; CABRAL, J.R.S (Org.) **Abacaxi produção: aspectos técnicos**. Brasília: Embrapa, p. 15-18, 2000.
- CABRAL, J.R.S.; MATOS, A.P.; JUGHANS, D.T. **Desenvolvimento de híbridos de abacaxi resistentes à fusariose**. Cruz da Almas, BA: Embrapa-CNPMF, 2003. 4p. (Embrapa-CNPMF. Comunicado Técnico, 88).
- CABRAL, J. R. S.; MATOS, A. P. de. **Imperial, nova cultivar de abacaxi**. Cruz das Almas, BA: Embrapa-CNPMF, 2005. 4 p. (Embrapa-CNPMF. Comunicado Técnico, 114).
- CARTER, W. The pineapple mealybug, *Pseudococcus brevipes* and wilt of pineapples. **Phytopathology**, Lancaster, v.23, n.3, p.207-242, 1933.
- CARTER, W. Notes on some mealybugs (coccidae) of economic importance in Ceylon, **Tropical Agriculturist**, Colombo. V.112, n. 2, p. 142-145, 1956.
- CECÍLIA, L. V. C. S.; ROSSI, M. M. Eficiência comparativa de alguns inseticidas e métodos de aplicação no controle da cochonilha do abacaxi. **Pesquisa agropecuária brasileira**. Brasília, v. 26, n.6, p. 846-848, 1991.
- COLLINS, J.L. **The pineapple, botany, cultivation and utilization**. Interscience Publishers, 244 p. 1992.

COSTA, A.; FONTOURA, T. Bromélias do Rio de Janeiro. **Ciência Hoje**, Rio de Janeiro, n. 9, p. 8-9, 1989.

COPPENS d'EECKENBRUGGE, G.; LEAL, F. Morphology, anatomy and taxonomy. In: BARTHOLOMEW, D.P.; PAULL, R.E.; ROHRBACH, K.G. **The pineapple**: botany, production, and uses. New York: CAB International, p.13-32, 2003.

CUNHA, G. A. P. da. Aspectos agroclimáticos. In: CUNHA, G.A.P. da; CABRAL, J. R. S., SOUZA, L. F. da S. (Org.). **O abacaxizeiro**: cultivo, agroindústria e economia. Brasília, DF: Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia, p. 53-66, 1999.

CUNHA, G. A. P. & REINHARDT, D. H. R. C. **Manejo de mudas de abacaxi. Cruz das Almas-BA**: Embrapa-CNPMPF, 2004. (Embrapa-CNPMPF. Comunicado técnico, 105).

CTENAS, M.L.B.; QUAIST, D. Abacaxi. In: CTENAS, M.L.B.; QUAIST, D. **Frutas das terras brasileiras**. São Paulo: C2, 2000.

FAO - **Food and Agriculture organization** of the United Nations. **FAOSTAT Countries by commodity**. Pineapples, 2011. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>>. Acesso em: 14 maio 2013.

FERNANDO, H. E. Pineapple and caco mealybugs of economic importance in Ceylon. **Tropical Agriculturist**, Colombo. V.112, n. 2, p. 131- 141, 1956.

FERREIRA, F.R.; CABRAL, J.R.S. Pineapple germplasm in Brazil. **Acta Horticulturae**, n.334, p.23-26, 1993.

FRANÇA-SANTOS, A.; ALVES, R. S.; N. S. Leite ; R. P. M. Fernandes. Estudos bioquímicos da enzima bromelina do Ananas comosus (abacaxi). **Scientia Plena** , v. 5, n. 11, p.1-6, 2009.

FRANCO, G. **Tabela de composição química dos alimentos**. Rio de Janeiro: Livraria Atheneu, 1989. 230 p.

GERMAN, T. L.; ULLMAN, D. E. GUNASINGHE UB. Mealybug wilt of pineapple: Advances in Disease Vector. **Research**, v. 9, p. 59- 241, 1992.

GUAMBLEY, A. B. C.; STEELE, A. D. W.; GEERING, A. D. W.; THOMAS, J.E. The genetic diversity of ampeloviruses in Australian pineapples and their association with mealybug wilt disease. **Australasian Plant Pathology**, Australia, v.37, p. 95-105, 2008.

GUERRA, M.P.; VESCO, L.L.V.; PESCADOR, R.; SCHUELTER, A. R.; NODARI, R. O. Estabelecimento de um protocolo regenerativo para micropropagação do abacaxizeiro. **Pesquisa Agropecuária**, Brasília, v.34, n.9, p. 1557- 1563, 1999.

GONDIM, J. A. M. ; MOURA, M. F. V. ; DANTAS, A. S. ; MEDEIROS, R. L. S. ; SANTOS, K. M. Composição centesimal e de minerais em casca de frutas. **Ciência tecnologia alimentos**, Campinas, v. 25, n. 4, p. 825-827, 2005.

GUNASINGHE, U.B.; GERMAN, T.L. Further characterization of a virus associated with mealybug wilt of pineapple. **Phytopathology**, v.77, p.1776, 1987.

GUNASINGHE, U.B.; GERMAN, T.L. Purification and partial characterization of a virus from pineapple. **Phytopathology**, v.79, n.12, p.1337-1341, 1989.

HAYS, W.P.; HAYS, R.V. The pineapple. In: HAYS, W.P.; HAYS, R.V. **Foods the Indians gave us**. New York: Ives Washburn, p.40-47, 1973.

HEENKENDA, H. M. S. Effect of plant size on sucker promotion in Mauritius pineapple by mechanical decapitation. **Acta Horticulture**, The Hague, v. 334, p. 331- 336, 1993.

HU, J.S.; SETHER, D.M.; ULLMAN, D.E. Detection of pineapple closterovirus in pineapple plants and mealybugs using monoclonal antibodies. **Plant Pathology**,v. 45, p. 829-836, 1996.

HU, J. S.; SETHER, D. M.; LIU, X. P.; WANG, M.; ZEE, F.; ULLMAN, D. E. Use of a tissue blotting immunoassay to examine the distribution of pineapple closterovirus in Hawaii. **Plant Disease**, v. 81, p.1150-1154, 1997.

IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Culturas temporárias e permanentes. **Produção Agrícola Municipal**, Rio de Janeiro, v. 38, p.1-97, 2011.

JAHN, G.C; BEARDSLEY, J.W.; GONZÁLEZ-HERNÁNDEZ, H. A Review of the Association of Ants with Mealybug Wilt Disease of Pineapple. **Hawaiian Entomological Society**. v. 36, p. 9-28, 2003.

KARASEV, A. V. Genetic diversity and evolution of closteroviruses. **Annual Review of Phytopathology**. v. 38, p. 293-324, 2000.

LEÃO, A. L.; MACHADO, I. S.; SOUZA, S. F.; SORIANO, L. Production of curaua fibers for industrial applications: characterization and micropropagation. **Acta Horticulturae**, João Pessoa, v. 822, p. 227-238, 2009.

LEME, M.M.C. Bromélias. **Ciência Hoje**, v.3, n.14, p. 66-72, 1984.

MACHADO, C. F.; SOUZA, F. V. D.; CABRAL, J. R. S.; SOUZA, E. H. Estado da arte do Banco Ativo de Germoplasma de Abacaxi da Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MELHORAMENTO DE PLANTAS. Guarapari. **O melhoramento e os novos cenários da agricultura**. Guarapari: SBMP, 2009.

MAYO, M. A. Virus taxonomy. **Archives of Virology**, Houston v. 147, n. 5, p. 1071-1076, 2002.

MANETTI, L. M.; DELAPORTE, R. H.; LAVERDE JUNIOR, A. Metabólitos secundários da família Bromeliaceae. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n.7, p.1885-1897, 2009.

MARTELLI, G. P., AGRANOVSKY, A. A., BAR-JOSEPH, M., BOSCIA, D., CANDRESSE, T. COUTTS, R. H. A., DOLJA, V. V., FALK, B. W., GONSALVES, D., JELKMANN, W., KARASEV, A. V., MINAFRA, A., NAMBA, S., VETTEN, H. J., WISLER, G. C., YOSHIKAWA, N. The family *Closteroviridae* revised. **Archives of Virology**, v. 147, n. 10, p. 2039-2045, 2002.

MARAMOROSCH, K.; GUAN, T.; GOSH, B. K. Virus-like particles associated with pineapple wilt disease. (Abstract) **Proceedings of the 6th International Congress of Virology**, 1984.

MARQUES, G.; GUTIÉRREZ, A.; DEL RIO, J. C. Chemical Characterization of Lignin and Lipophilic Fractions from Leaf Fibers of Curaua (*Ananas erectifolius*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 55, n. 4, p. 1327-1336, 2007.

MEDINA, J.C. A cultura do abacaxi. In: MEDINA, J.C. et al. **Frutas tropicais 2**. São Paulo, p.06-68, 1978.

MEDINA, J. C. Abacaxi: cultura, matéria-prima, processamento e aspectos econômicos. Campinas: Instituto de Tecnologia de Alimentos, 1987, 285 p.

MELZER, M. J., KARASEV, A. V., SETHER, D. M., HU, J. S. Nucleotide sequence, genome organization and phylogenetic analysis of pineapple mealybug wilt-associated virus-2. **Journal of General Virology**, Hawaii, v. 82, p. 1-7, 2001.

MELZER, M.J.; SETHER, D.M.; KARASEV, A.V.; BORTH, W.; HU, J.S. Complete nucleotide sequence and genome organization of pineapple mealybug wilt-associated virus-1. **Archives of Virology**, v. 153, p. 707–714, 2008.

MENEZES, E. B.; SUZUCHI, J.; BATISTA, L. B.; ISMAEL, A. J. O emprego de inseticidas granulados no combate à cochonilha-farinhenta-do-abacaxi, *Dysmicoccus brevipes* (Cockerell, 1893), (Homoptera: Pseudococcidae). **Anais da Sociedade Entomológica Brasileira**. v.6, n.2, p. 287-294, 1977.

NOKANO, O.; PARRA, J. R. P. O emprego de Disyston granulado 2,5 % no combate à cochonilha-do-abacaxi. In: **Encontro da sociedade brasileira de defesa da lavoura e pecuária**, 1. 1967, São Paulo. São Paulo: Sociedade Brasileira de Defesa da Lavoura e Pecuária.

PAULA, C. C. **Cultivo de bromélias**. Viçosa: Aprenda fácil, 2000, 139p.

PAULA, C.C. ; SILVA, H.M.P. **Cultivo de bromélias**. Viçosa: UFV, 2004.

REINHARDT, D. H.; SOUZA, J. S. Pineapple industry and research in Brazil. **Acta Horticulturae**, Wageningen, n. 529, p.57-71, 2000.

ROHRBACH, K. G.; BEARDSLEY, J. W.; GERMAN, T. L.; REIMER, N. J.; SANFORD, W. G. Mealybug wilt, mealybugs, and ants on pineapple. **Plant Disease**. v. 72, p. 65- 558, 1988.

ROHRBACH, K. G.; JOHNSON, M. W. Pests, diseases and weeds. In: BARTHOLOMEW, D. P.; PAUL, R. E.; ROHRBACH, K. G. (Ed.). **The pineapple: botany, production and uses**. Oxon: CAB International, p. 203-251, 2003.

RODRIGUES, T.M.; PAIVA, P.D.; RODRIGUES, C.R.; CARVALHO, J.G.; FERREIRA, C.A.; PAIVA, R. Desenvolvimento de mudas de bromélia-imperial (*Alcantarea imperialis*) em diferentes substratos. **Ciência Agrotécnica**, Lavras, v. 28, n. 4, p. 757-763, 2004.

ROSSI, N. D.; TAMBOURGI, E. B. Recuperação e concentração da bromelina a partir do abacaxi, utilizando o processo por membrana. In: CONGRESSO DE

INICIAÇÃO CIENTÍFICA UNICAMP, 13. Campinas. **Resumos...** Campinas: UNICAMP, 2005.

SANCHES, N.F.; DIAMANTINO, E.P. Índices de infestação da cochonilha *Dysmicoccus brevipes* (Hemiptera: Pseudococcidae) em abacaxizeiro sob regime de irrigação. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA, 16, Salvador, 1997. **Resumos ...** Salvador: Sociedade Brasileira de Entomologia, p.220, 1997.

SANCHES, N.F. Pragas do abacaxi e meios de controle. Cruz das Almas: Embrapa- CNPMF, 1986. 11p. Trabalho apresentado no 3º Curso Intensivo Nacional de Fruticultura, 1986.

SANCHES, N.F.; DIAMANTINO, E.P. Índices de infestação da cochonilha *Dysmicoccus brevipes* (Hemiptera: Pseudococcidae) em abacaxizeiro sob regime de irrigação. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA, 16, Salvador, 1997. **Resumos ...**Salvador: Sociedade Brasileira de Entomologia, 1997. p. 220.

SANCHES, N.F.; MATOS, A.P.; MEISSNER FILHO, P.E. Murcha associada à cochonilha. In: REINHARDT, D. H.; SOUZA, L.F.S.; CABRAL, J.R.S. (Org). **Abacaxi- Produção : aspectos técnicos**. Cruz das Almas: Embrapa- CNPMF, Brasília, DF: Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia, p. 62-65, 2000.

SANCHES, N.F.; MATOS, A.P. Murcha associada à cochonilha *Dysmicoccus brevipes* (Cockerell,1893). In: **O abacaxizeiro: cultivo, agroindústria e economia**: Brasília: EMBRAPA-CNPMF, p. 343-366, 1999.

SANTOS, A.I.; PORTUGAL, A.M.; MEISSNER FILHO, P.E.; SANCHES, N.F.; SANTOS, L.S.; CABRAL, J.R.S. Indexação de germoplasma para a murcha do abacaxi. In: Congresso Brasileiro de Fitopatologia, 36., 2002, Recife. **Resumos...** Fortaleza: Sociedade Brasileira de Fitopatologia, p. 212, 2002.

SANEWSKI, G. M. Breeding Ananas for the cut-flower and garden markets. **Acta Horticulturae**, v. 822, p. 71-78, 2009.

SETHER, D. M.; KARASEV, A. V.; OKUMURA, C.; ARAKAWA, C.; ZEE F.; KISIAN, M. M.; BUSTO, J.L.; HU, J. S. Differentiation, distribution and

elimination of two different pineapple mealybug wilt-associated viruses found in pineapple. **Plant Disease**, Hawaii, v.85, n.8, p. 856–864, 2001.

SETHER, D. M.; HU, J.S. Closterovirus infection and mealybug exposure are necessary for the development of mealybug wilt of pineapple disease. **Phytopathology**, v. 92, p. 928–935, 2002 a.

SETHER, D.M. e HU, J.S. Yield impact and spread of Pineapple mealybug wilt associated virus-2 and mealybug wilt of pineapple in Hawaii. **Plant Disease**, v. 86, p. 867–874, 2002b.

SETHER, D.M.; MELZER, M.J.; BORTH, W.B; HU, J.S. Genome organization and phylogenetic relationship of Pineapple mealybug wilt associated virus-3 with family Closteroviridae Members. **Virus Genes**, v. 38, p.414–420, 2009.

SETHER, D.M., MELZER, M.J. AND HU, J.S. Pineapple mealybug wilt associated viruses 1, 3, and 4, and Grapevine leafroll associated viruses 4, 5, 6, and 9 are a distinct group in the genus Ampelovirus. **Abstract...Proceedings XIII International Congress of Virology**, 2005b.

SETHER, D. M.; MELZER, M. J.; BUSTO, J.; ZEE, F.; HU, J. S. Diversity and mealybug transmissibility of ampeloviruses in pineapple. **Plant Disease**, Hawaii,v. 89, p. 450-456. 2005.

SILVA, S.; TASSARA, H. Abacaxi. In: SILVA, S.; TASSARA, H. **Frutas no Brasil**. São Paulo: Nobel, p.25-27, 2001.

SIMÃO, S. O abacaxizeiro. In: SIMÃO, S. **Tratado de fruticultura**. Piracicaba: FEALQ, p. 249-288,1998.

SINGH, S. J.; SASTRY, K. S. M. Wilt of pineapple – a new virus disease in India. **Indian Phytopathology**, v. 27, p. 298-303, 1974.

SOUZA, J. S. ; SOUZA, L. F. S. **Aspectos socioeconômicos** . In: REINHARDT, D. H.; SOUZA, L. F. S.; CABRAL, J. R. S. (Org.). Abacaxi produção: aspectos técnicos. Brasília: Embrapa, p.7, 2000.

SOUZA, L. F. S.; REINHARDT, D. H.; CABRAL, J. R. S. **Introdução**. In: REINHARDT, D. H.; SOUZA, L. F. S.; CABRAL, J. R. S. (Org.). Abacaxi produção: aspectos técnicos. Brasília: Embrapa, . p. 9, 2000.

SOUZA, V.C. e LORENZI, H. **Botânica Sistemática – guia ilustrado para ENCICLOPÉDIA BIOSFERA**. Centro Científico Conhecer, Goiânia, v.8, n.15; p.

identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2005.

SOUZA, F.V.D.; CABRAL, J.R.S.; SOUZA, E. H.; FERREIRA, F. R.; SILVA, M. J. Evaluation of F1 hybrids between *Ananas comosus* var. *ananassoides* and *Ananas comosus* var. *erectifolius*. **Acta Horticulturae**, v. 822, p. 79-84, 2009.

SOUZA, E. H.; SOUZA, F. V. D.; COSTA, M. A. C.; COSTA Jr., D. S.; SANTOS-SEREJO, J. A.; AMORIN.E. P.; LEDO, C. A. S. Genetic variation of the *Ananas* genus with ornamental potential. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 58, p. 23-40, 2011.

ULLMAN, D. E., GERMAN, T. L., GUNASINGHE, U. B., EBESU, R. H. Serology of a closteroviruslike particle associated with mealybug wilt of pineapple. **Phytopathology**, v. 79, p. 1341-1345, 1989.

ULLMAN, D. E.; GERMAN, T. L.; MCINTOSH, C. E.; WILLIAMS, D. D. F. Effect of heat treatment on a closteroviruslike particle associated with mealybug wilt of pineapple. **Plant Disease**, v. 75, p. 859-861, 1991.

VAILLANT, F.; MILLAN, A.; DORNIER, M.; DECLOUX, M.; REYNES, M. Strategy for economical optimization of the clarification of pulpy fruit juices using crossflow microfiltration. **Journal of Food Engineering**, v.48, p.83-90, 2001.

VELAME, K.V.C.; MEISSNER, P.E.F.; SANTOS, L.S.; PORTUGUAL, A.M. Produção de anti-soro contra o vírus associado com a murcha do abacaxizeiro (*Pineapple mealybug wilt- associated vírus*). **Summa Phytopathologica**, v. 30, n. 3, p 346-349, 2004.

VENTURA, J.A.; ZAMBOLIM, L. Controle das doenças do abacaxizeiro. In: ZAMBOLIM, L.; VALE, F. X. R. do; MONTEIRO, A. J. A.; COSTA, H. (Org.). Controle de doenças de plantas frutíferas. Viçosa, v.1, p. 445-509,2002.

WANDERLEY, M.G.L.; MARTINS, S.E. **Bromeliaceae**. In: WANDERLEY, M.G.L.; SHEPHERD, G.J.; MELHEM, T.S.; GIULIETTI, A.M. (coord.). Flora fanerogâmica do Estado de São Paulo. São Paulo: Instituto de Botânica, p. 39-161, 2007.

WAKMAN, W., TEAKLE, D. S., THOMAS, J. E., AND DIETZGEN, R. G. Presence of a clostero-like virus and a bacilliform virus in pineapple plants in Australia. **Agricultural Research**, v. 46, p. 947-958, 1995.

XIE, W. D.; XING, D. M.; SUN, H.; WANG, W.; DING, Y.; DU, L. J.; AM. J. The Effects of *Ananas comosus* L. Leaves on diabetic-dyslipidemic rats induced by alloxan and a high-fat/high-cholesterol diet. **The American Journal of Chinese Medicine**, China, v. 33, n. 1, p. 95-105, 2005.

XIE, W.; WANG, W.; SU, H.; XING, D.; PAN, Y.; DU, L. Effect of ethanolic extracts of *Ananas comosus* L. leaves on insulin sensitivity in rats and HepG2. **Comparative Biochemistry and Physiology**, China, v. 143, p. 429-435, 2006.

CAPÍTULO 1

PREVALÊNCIA DO *Pineapple mealybug wilt-associated vírus* (PMWaV), NO BANCO ATIVO DE GERMOPLASMA DE ABACAXI DA EMBRAPA MANDIOCA E FRUTICULTURA

Capítulo formatado de acordo com a revista Plant disease

RESUMO

Santos, K.C. Prevalência do *Pineapple mealybug wilt-associated virus* (PMWaV) no banco ativo de germoplasma de abacaxi da Embrapa Mandioca e Fruticultura.

O PMWaV é o agente etiológico responsável por causar a murcha do abacaxi. Induz a perda de turgescência nos tecidos foliares, provocando sintomas como pontas secas, avermelhamento e amarelecimento das folhas. As cochonilhas (*Dysmicoccus brevipes* e *D. neobrevipes*) são vetores das três espécies virais (PMWaV-1, 2 e 3). Com a susceptibilidade do gênero *Ananas* a esse vírus e a possibilidade de transmissão a partir da propagação vegetativa, se fez necessário avaliar por indexação, as plantas conservadas no Banco de Germoplasma de Abacaxi do CNPMF. Informações dessa natureza poderão ajudar no direcionamento de acessos para um programa de limpeza clonal, bem como indicar aqueles que possam ter resistência. O objetivo deste trabalho foi avaliar a incidência do PMWaV-1,2,3 nos acessos do BAG da Embrapa Mandioca e Fruticultura em quatro variedades de *Ananas comosus*, uma em *macrodontes* e em sete espécies de bromélias. Todas as plantas foram avaliadas com a técnica de RT-PCR, com o uso dos primers específicos para as três espécies virais. Os resultados demonstraram que todas as variedades pertencentes à espécie *A. comosus*, estavam infectadas pelo PMWaV. O PMWaV-1 foi o único vírus não encontrado em *A. macrodontes*. A maioria das bromélias estavam infectadas pelos PMWaV-2 e PMWaV-3. A presença do PMWaV em diferentes espécies de bromélias, se configura um fato inédito e deverá abrir espaço para discussão em relação ao seu papel como fonte de disseminação do vírus.

Palavras-chave: Cochonilha, *Ampelovirus*, Murcha.

ABSTRACT

Santos, K.C. Prevalence of the pineapple mealybug wilt-associated virus (PMWaV) in the pineapple active germplasm bank of Embrapa Cassava and Fruits.

The PMWaV is the etiologic agent responsible for causing "pineapple wilt". It induces the loss of leaf turgidity, causing symptoms such as dry ends, redness and yellowing of leaves. Popularly known as mealybug, *Dysmicoccus brevipes* and *D. neobrevipes* are the vectors responsible for the transmission of the three virus species (PMWaV-1, 2 and 3). Considering the susceptibility of the genus *Ananas* to these viruses and the possibility of transmission through vegetative propagation, it is necessary to evaluate by virus indexing the plants maintained in the pineapple germplasm bank of Embrapa Cassava and Fruits. Such information may help in directing accessions to a clonal cleaning program, and indicate those that may have resistance as well. This work aims to evaluate the incidence of PMWaV-1, 2, 3 in accessions of the pineapple germplasm bank of Embrapa Cassava and Fruits including four varieties of *Ananas comosus*, one variety of *Ananas macrodontes* and seven species of bromeliads. All plants were assessed by RT-PCR using primers specific to the three virus species. The results showed that all *A. comosus* varieties were infected by PMWaV. The PMWaV-1 was the only virus not found in *A. macrodontes*. Most bromeliads were infected with PMWaV-2 and PMWaV-3. The presence of PMWaV in different species of bromeliads is an new fact and should open a space for discussion in relation to its role as a source of virus spread.

Keywords: mealybug, *Ampelovirus*, pineapple wilt.

INTRODUÇÃO

O gênero *Ananas* Miller, pertence à ordem Poales, família *Bromeliaceae* e juntamente com outros 58 gêneros e 3172 espécies, constitui a maior família de distribuição natural restrita ao Novo Mundo, com exceção da *Pitcairnia feliciana* (Aug. Chev.) Harms & Mildbr, nativa da Guiné (GIVINISH et al., 2007; 2011; SMITH, 1934; SMITH e DOWNS, 1979).

A família *Bromeliaceae* tem ocorrência praticamente em todo território nacional e em todos os ecossistemas, com maior diversidade na região Sudeste, principalmente na região da Mata Atlântica (LEME e SIQUEIRA FILHO, 2006). O abacaxi cultivado [*Ananas comosus* var. *comosus*] é a espécie mais importante da família *Bromeliaceae* e largamente consumida no Brasil e no mundo.

A classificação botânica do abacaxi é considerada uma das mais conturbadas da família *Bromeliaceae*, provavelmente pelo viés agrônomo do gênero e tem sido frequentemente revisada. A classificação atual (COPPENS D'EECKENBRUGGE e LEAL, 2003), considera apenas um gênero e o divide em duas espécies: *Ananas comosus* (L.) Merrill e *Ananas macrodontes* Morren. A primeira é composta de cinco variedades botânicas (*A. comosus* var. *comosus*, *A. comosus* var. *ananassoides* (Baker) COPPENS e LEAL, *A. comosus* var. *bracteatus* (Lindl.) COPPENS e LEAL, *A. comosus* var. *erectifolius* (L. B. Smith) COPPENS e LEAL, e *A. comosus* var. *parguazensis* (Camargo & L. B. Smith) COPPENS e LEAL. Já o *A. macrodontes* é monoespecífico.

A oferta de novas variedades de abacaxizeiro é dependente da identificação de novos materiais no recurso genético existente dentro do gênero ou da geração de híbridos a partir da criação de um programa de melhoramento genético. Isso justifica a necessidade do estabelecimento de bancos de germoplasma que resguardem a variabilidade genética existente.

O banco ativo de germoplasma de abacaxi (BAG Abacaxi) da Embrapa Mandioca e Fruticultura é constituído atualmente de 617 acessos, dos quais 65 % são de *A. comosus* var. *comosus*. Adicionalmente conta com acessos das

outras variedades botânicas e outros gêneros afins da família *Bromeliaceae*, como *Bromelia*, *Dickia*, *Tillandsia* e *Bilbergia* (MACHADO et al., 2009).

Essa coleção foi estabelecida e vem sendo mantida nos últimos 30 anos em condições de campo e ampliada por meio de coletas e intercâmbios de germoplasma entre instituições. Ao longo dos anos vários problemas foram registrados, como perda de acessos por falta de adaptação às condições de cultivo, caso das variedades *Parguazensis*, assim como ataques de pragas ou doenças. Nos últimos dez anos tem-se observado um aumento significativo de acessos com sintomas de murcha (dados não publicados).

O *Pineapple mealybug wilt-associated vírus* (PMWaV), é um vírus que infecta o abacaxi, causa a doença murcha do abacaxizeiro. O vírus é transmitido pelas cochonilhas, *Dysmicoccus brevipes* e *D. neobrevipes*. A doença é causada por um complexo viral, composto por três espécies: PMWaV-1, PMWaV-2 e PMWaV-3, que se diferenciam pela sequência e organização do genoma. O PMWaV-2 quando associado com a cochonilha, causa sintomas mais intensos na planta do que o PMWaV-1 e PMWaV-3 (SETHER et al., 2001, MELZER et al., 2008; SETHER et al., 2009). Com a susceptibilidade do gênero *Ananas* a essa doença e a possibilidade de transmissão desse vírus a partir da propagação vegetativa, deu-se início à realização de testes de indexação em acessos do BAG. Com a finalidade de mapear os acessos infectados e avaliar a prevalência do PMWaV nas espécies e variedades botânicas conservadas.

Informações dessa natureza poderão ajudar no encaminhamento dos acessos para um programa de limpeza clonal, bem como identificar acessos que permanecem sadios apesar de plantados sempre ao lado de outros infectados, como indicativos de resistência. Diante disso, o objetivo deste trabalho, foi a avaliar a ocorrência do PMWaV em quatro variedades de *A. comosus*, uma de *A. macrodontes* e sete espécies de bromélias, oriundos do BAG abacaxi do CNPMF, assim como mapear a frequência de ocorrência entre e dentro dos acessos.

MATERIAIS E MÉTODOS

Coleta das amostras

Foram utilizadas amostras foliares de 64 acessos (1 planta por acesso-considerando uma amostra representativa dentro da coleção) de abacaxi e 18 espécies (1 planta por acesso) de bromélias, oriundas do Banco Ativo de Germoplasma de abacaxi (BAG abacaxi) da Embrapa Mandioca e Fruticultura que foram coletadas em diferentes regiões do Brasil e em uma cidade da França.

Tabela 1. Acessos das variedades de abacaxi, pertencentes ao Banco Ativo de Germoplasma e sua origem.

ACESSOS	ESPÉCIE/BROMÉLIA	CIDADE/ESTADO	PAÍS	
1	comosus	Coração de Maria	BA	Brasil
10	comosus	Campinas	SP	Brasil
43	comosus	Macompuri	AM	Brasil
124	comosus	Ilha Solteira	SP	Brasil
146	comosus	Cruz das Almas	BA	Brasil
148	comosus	Cruz das Almas	BA	Brasil
159	comosus	Cruz das Almas	BA	Brasil
177	comosus	Coração de Maria	BA	Brasil
179	comosus	Porto Velho	RO	Brasil
180	comosus	Porto Velho	RO	Brasil
189	comosus	Ariquemes	RO	Brasil
244	comosus	Tucuri	PA	Brasil
296	comosus	Rio Branco	AC	Brasil
343	comosus	Careiro	AM	Brasil
433	comosus	Rio Branco	AC	Brasil
2	bracteatus	Campinas	SP	Brasil
3	bracteatus	Campinas	SP	Brasil
35	bracteatus	Santo Amaro	BA	Brasil
45	bracteatus	Paracatu	MG	Brasil

56	bracteatus	Amélia Rodrigues	BA	Brasil
119	bracteatus	Itaipú	PR	Brasil
123	bracteatus	Araguaiana	GO	Brasil
126	bracteatus	Araguaiana	GO	Brasil
128	bracteatus	Araguaiana	GO	Brasil
210	bracteatus	Ortigueira	PR	Brasil
408	bracteatus	Arroz do Meio	RS	Brasil
495	bracteatus	Porto Lucena	RS	Brasil
510	bracteatus	São Paulo	SP	Brasil
543	bracteatus	Arroz do Meio	RS	Brasil
584	bracteatus	Concórdia	SC	Brasil
690	bracteatus	Tenente Portela	RS	Brasil
692	bracteatus	Bebedouro	SP	Brasil
776	bracteatus	Martinica	SP	França
25	ananassoides	Campinas	SP	Brasil
27	ananassoides	Bandeirantes	MS	Brasil
46	ananassoides	Brasília	DF	Brasil
174	ananassoides	Brasília	DF	Brasil
195	ananassoides	Macapá	AP	Brasil
196	ananassoides	Macapá	AP	Brasil
197	ananassoides	Ji-Paraná	RO	Brasil
198	ananassoides	Porto Velho	RO	Brasil
199	ananassoides	Macapá	AP	Brasil
201	ananassoides	Colorado do Oeste	RO	Brasil
202	ananassoides	Ariquemes	RO	Brasil
203	ananassoides	Ariquemes	RO	Brasil
208	ananassoides	Pimenta Bueno	RO	Brasil
79	macrodontes	Brasília	DF	Brasil
81	macrodontes	Brasília	DF	Brasil
82	macrodontes	Brasília	DF	Brasil
83	macrodontes	Brasília	DF	Brasil
121	macrodontes	Querencia do Norte	PR	Brasil
168	macrodontes	Brasília	DF	Brasil
170	macrodontes	Brasília	DF	Brasil
299	macrodontes	Porto Murtinho	MS	Brasil
300	macrodontes	Caracol	MS	Brasil

301	macrodontes	Corumbá	MS	Brasil
302	macrodontes	Corumbá	MS	Brasil
610	macrodontes	Roque Gonzales	RS	Brasil
722	macrodontes	Belmonte	BA	Brasil
67	erectifolius	Brasília	DF	Brasil
709	erectifolius	São Gabriel	AM	Brasil
739	erectifolius	Belém	PA	Brasil
750	erectifolius	Fortaleza	CE	Brasil
804	erectifolius	Mossoró	RN	Brasil

Tabela 2. Acessos das espécies de bromélias pertencentes ao Banco Ativo de Germoplasma de abacaxi e sua origem.

ACESSOS	ESPÉCIE/BROMÉLIA	CIDADE/ESTADO	PAÍS
98	B. laciniosa	Brasília DF	Brasil
100	B. balansae	Brasília DF	Brasil
165	B. balansae	Brasília DF	Brasil
278	B. balansae	Invinhema MS	Brasil
279	B. balansae	Caarapo MS	Brasil
280	B. balansae	Eldorado MS	Brasil
281	B. balansae	João Antônio MS	Brasil
164	Bilbergia sp.	Brasília DF	Brasil
176	Bilbergia sp.	Brasília DF	Brasil
166	B. goeldiana	Brasília DF	Brasil
212	B. goeldiana	Ariquemes RO	Brasil
213	B. goeldiana	Ariquemes RO	Brasil
222	B. goeldiana	Vilhena RO	Brasil
171	Tillandsia sp.	Brasília DF	Brasil
303	Tillandsia sp.	Invinhema MS	Brasil
305	Tillandsia sp.	Porto Murtinho MS	Brasil
307	Dickia sp.	João Antônio MS	Brasil
314	B. caratas	Jaicos PI	Brasil

Extração do RNA total

A extração do RNA total foi realizada com o auxílio do reagente Trizol® (Invitrogen), de acordo com as indicações do fabricante. Cerca de 100 mg de tecido da folha foram coletados, macerados em nitrogênio líquido e transferidos para microtubos de 1,5 mL. Foi adicionado 1mL de reagente Trizol® e as amostras homogeneizadas. Em seguida, adicionou-se 250 µL de clorofórmio, as amostras foram agitadas por 15 segundos e incubadas no gelo por 5 minutos. Posteriormente, procedeu-se uma centrifugação a 12,000 x g por 15 minutos a 4°C. O sobrenadante foi transferido para novos tubos e adicionados 500 µL de álcool isopropílico. As amostras foram incubadas novamente por 2 minutos no gelo e, posteriormente, centrifugadas a 12.000 r.p.m por 20 minutos a 4°C. O sedimento obtido foi lavado com etanol 75% e depois diluído em 30 µL de água livre de nucleases. As amostras foram conservadas a -80°C.

Detecção das espécies do PMWaV por RT-PCR (Transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase).

A transcrição reversa (RT) consistiu de duas etapas consecutivas. Durante a primeira, foram adicionados em um microtubo: 5 µg de RNA total, 2 pmol de hexâmeros de sequência aleatória e água livre de nucleases, completando o volume para 12 µL. A amostra foi incubada por 3 min a 70°C e, transferida imediatamente para o gelo. Na segunda etapa foram adicionados ao microtubo: 4 µL do tampão da reação, 2 µL de ditioneitol (DTT) 0,1M, 1µL da mistura de dNTPs a 10mM; 1µL (200U) da enzima transcriptase reversa (M-MLV, Invitrogen). A reação final foi incubada a 37°C por 1 h e em seguida a 70°C por 10 min.

A região genômica HSP 70, foi amplificada via Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), com o auxílio de primers específicos para o PMWaV-1, PMWaV-2 e PMWaV-3 (Tabela 3). Acrescentando 2,5 µL do cDNA, 5 µL do tampão da PCR (200 mM Tris-HCl, pH 8.4, 500 mM KCl), 3 µL de MgCl₂ 25 mM, 1µL da mistura de dNTPs a 2,5 mM cada, 0,5 µL (1U) da Taq Platinum

DNA polimerase (Invitrogen), e 0,5 μ M de cada oligonucleotídeo, e o volume da reação foi completado para 50 μ L adicionando-se água livre de nuclease. O processo de amplificação consistiu de uma desnaturação inicial a 94 °C por 3 minutos, seguida de 35 ciclos que envolvem as etapas sequenciais de desnaturação (94 °C/ 45 s) e (94 °C/3 min), anelamento dos primers (48 °C/45 s) e extensão (72 °C/1 min). Os amplicons foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1%.

Tabela 3 - Sequência dos oligonucleotídeos utilizados nas reações, de acordo com Sether et al. (2001) e (2005).

Oligonucleotídeos	Sequências
PMWaV- 1 (F)	5' ACA GGA AGG ACA ACA CTC AC 3'
PMWaV- 1 (R)	5' CGC ACA AAC TTC AAG CAA TC 3'
PMWaV- 2 (F)	5' CAT ACG AAC TAG ACT CAT ACG 3'
PMWaV- 2 (R)	5' CCA TCC ACC AAT TTT ACT AC 3'
PMWaV- 3 (F)	5' AGT TCA CTG TAC ATT TCG GA 3'
PMWaV- 3 (R)	5' ATT GAT CGA TGT GTA TCG 3'

Análise da severidade dos sintomas

Após a confirmação de plantas positivas para o vírus, foi realizada uma avaliação visual para averiguação da presença e severidade de sintomas (Figura 2). Foi desenvolvida uma escala de notas simples, com base nos sintomas característicos provocados pela doença. As notas obtidas foram resultantes das observações de três avaliadores.

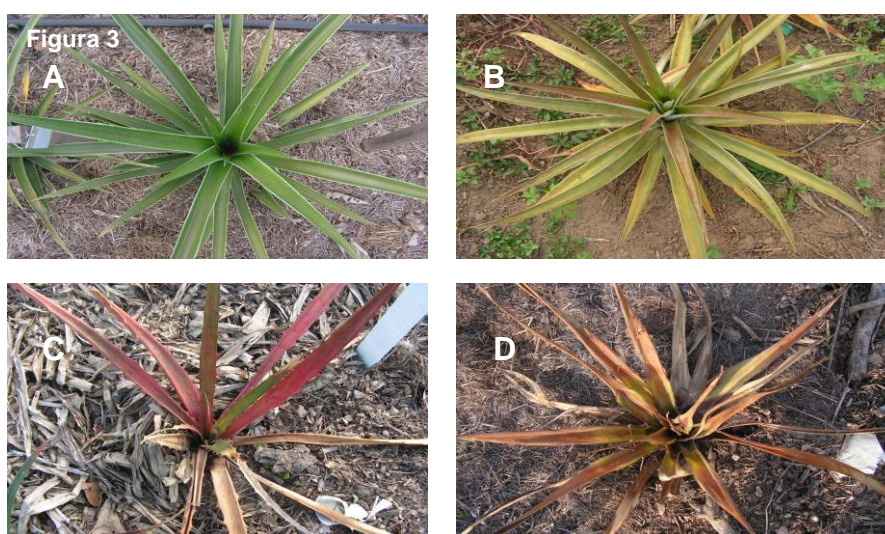


Figura 2 e 3: Principais características consideradas na escala de notas para averiguação dos sintomas causados pela murcha do abacaxizeiro: **A. 0:** A planta apresenta-se com aspecto sadio, sem sintomas visíveis de murcha. **B) Nível 1 (severidade baixa) :** A planta começa a exibir poucos sintomas de amarelecimento em algumas folhas e o “Dye back” começam a ficar visíveis a partir do ápice das folhas. **C) Nível 2 (severidade mediana) :** Em várias partes da planta, as folhas de amareladas passam a ficar avermelhadas e o “Dye back” começa a percorrer por toda a folha. **D) Nível 3 (severidade elevada):** Os sintomas são visíveis em praticamente todo o abacaxizeiro; as folhas começam a perder turgescência, tornam-se secas a partir do ápice em direção à base (morte descendente), os bordos das folhas ficam todos dobrados para baixo. Consequentemente há um comprometimento total das folhas e posterior morte do abacaxizeiro.

Análise dos dados

Para os dados de ocorrência de vírus e intensidade de sintomas, foram calculadas as frequências absolutas e relativas para cada variedade (ou local ou cultivar). As análises estatísticas foram realizadas com auxílio do programa estatístico SAS - Statistical Analysis System (SCHLOTZHAUER e LITTELL, 1997).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A prevalência (consolidada) das três espécies do PMWaV entre e dentro das quatro variedades botânicas de *Ananas comosus* e uma de *Ananas macrodontes* esta decrito na Tabela 1. Essa frequência considera a infecção simples e mista, o que justifica valores que não somam 100% na linha e também na coluna. A frequência detalhada se encontra na tabela 2.

Neste estudo foram avaliadas um total de 64 acessos do gênero *Ananas*, das quais apenas 4 (6,25%) estavam livres do vírus. Houve uma elevada ocorrência do PMWaV em todas as variedades analisadas, mas apenas *comosus* e *bracteatus* tiveram 100% dos acesos infectados. Além disso, são as que possuem a maior incidencia dos três virus entre as variedades analisadas.

Em *A. macrodontes* apesar da alta ocorrência (84,6%) dos vírus entre os 11 acessos, não foi detectado o PMWaV-1. Em *Ananassoides*, o vírus só foi detectado em apenas uma das treze plantas testadas (ou 7,69%). Similarmente, em *Erectifolius* o PMWaV-1 foi detectado em apenas um dos cinco acessos testados (20%). Mesmo nas duas variedades em que atinge uma maior incidência (*Bracteatus* e *Comosus*), o PMWaV-1 não prevalece sobre o PMWaV-2 e PMWaV-3. Em geral, os menores valores prevalentes entre as espécies virais foi do PMWaV-1.

Tabela 1 - Ocorrência das três espécies do PMWaV, em quatro variedades botânicas de abacaxi da espécie *Ananas comosus* e 13 acessos *Ananas macrodontes*. Observação: considerou-se infecção única ou mista (tabela consolidada).

Variedade	n° de acessos *infectados/testados	PMWaV-1	PMWaV-2	PMWaV-3
Ananassóides	12/13 (92,3%)	1 (7,69%)	8 (61,53%)	9 (69,23%)
Bracteatus	18/18 (100%)	9 (50,0%)	12 (66,66%)	13 (72,22%)
Comosus	15/18 (83%)	11 (73,33%)	12 (80,0%)	11 (73,33%)
Erectifólius	4/5 (80,0%)	1 (20,0%)	4 (80,0%)	3 (60,0%)
Macrodontes	11/13 (84,6%)	(0%)	10 (76,92%)	8 (61,53%)
Total de plantas	60/64 (93,75%)	25 (39,0%)	46 (71,87%)	44 (68,75%)

* Entre parênteses: percentagem dos acessos infectados.

Ao considerar todos os acessos analisados, foi observado maior prevalência do PMWaV-2, seguido do PMWaV-3 e do PMWaV-1. O PMWaV 2 e PMWaV-3, estão presentes em todas as variedades das espécies *Ananas comosus* e *Ananas macrodontes* analisadas e estão distribuídos entre as variedades de forma mais homogênea.

A ausência do PMWaV-1 em *Ananas macrodontes*, pode indicar algum mecanismo de resistência específica para este vírus. Foram avaliados 13 acessos dessa espécie, considerando uma amostra representativa dentro da coleção. Existe a possibilidade dos acessos testados não terem sido inoculadas naturalmente com o PMWaV-1. Mas a elevada ocorrência da murcha nos acessos do BAG de abacaxi pelos três vírus, indica uma alta taxa de disseminação pela cochonilha.

A elevada ocorrência viral nos acessos indexados também demonstrou que a infecção mista é frequente (Tabela 2). Todas as variedades botânicas avaliadas estavam com infecção mista.

Tanto *bracteatus*, *comosus*, *erectifolius* e *ananassoides* possuíam plantas com infecção tripla, ressaltando que nos acessos de *bracteatus* e *comosus* o número de plantas com a presença das três espécies é mais elevada (28% e 40%, respectivamente).

Os elevados valores de infecção mista (Tabela 2) indicam que os três vírus estão presentes entre os acessos há um tempo relativamente longos. Estas espécies virais estão amplamente disseminadas, mesmo com o controle da cochonilha sendo exercido na área, com o uso de inseticidas. Além disso, os acessos são propagados vegetativamente e sempre na mesma ordem. Assim, estas plantas com infecção mista podem ter adquirido os vírus em sucessivas inoculações, com um vírus de cada vez, ou com inoculações duplas ou triplas.

Os acessos indexados foram avaliados quanto à severidade da murcha (Tabela 3), de acordo com uma escala de notas (Figura 2). Entre os acessos analisados, apenas sete (10,94%) não apresentaram sintomas de murcha. A maioria (72%) apresentou severidade entre os níveis 1 e 2 e somente (17,2%) apresentou a maior severidade da doença.

Na variedade comosus, todas as plantas apresentaram sintomas, embora 60% delas exibiram sintomas pouco severos (nível 1). Na variedade ananassóides e na espécie *Ananas macrodontes* foram observados plantas com sintomas entre os níveis intermediários (níveis 1 e 2). Importante notar que também foi observado um maior número de plantas sem sintomas (23,08% em ambas) e uma baixa frequência de plantas com alta severidade. Em *Erectifolius*, apesar do reduzido número de plantas avaliadas, a maioria (60%) exibiram sintomas severos de murcha. Em *Bracteatus* apenas uma planta não apresentou sintomas, mas a maioria das plantas que apresentaram sintomas foi enquadrada nos níveis intermediários.

Tabela 2– Prevalência datalhada, considerando infecção simples e mista, entre e dentro da espécie macrodontes e das quatro variedades botânicas de abacaxi

Variedades	n° de acessos infectados/ testados	PMWaV-1	PMWaV-2	PMWaV-3	PMWaV-1/PMWaV-2	PMWaV-1/PMWaV-3	PMWaV-2/PMWaV-3	PMWaV-1-2-3
Ananassóides	12/13 (92,3)	0 (0,00)	3 (23,08)	4 (30,77)	0 (0,00)	0 (0,00)	4 (30,77)	1 (7,69)
Bracteatus	18/18 (100)	1 (5,56)	4 (22,22)	2 (11,11)	0 (0,00)	3 (16,67)	3 (16,67)	5 (27,78)
Comosus	15/18 (83)	2 (13,33)	0 (0,00)	0 (0,00)	2 (13,33)	1 (6,67)	4 (26,67)	6 (40,00)
Erectifólius	4/5 (80,0)	0 (0,00)	1 (20,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	2 (40,00)	1 (20,00)
Macrodonates	11/13 (84,6)	0 (0,00)	3 (23,08)	1 (7,69)	0 (0,00)	0 (0,00)	7 (53,85)	0 (0,00)
Total	60/64 (93,75)	3 (4,69)	11 (17,19)	7 (10,94)	2 (3,13)	4 (6,25)	20 (31,25)	13 (20,31)

Tabela 3 - Prevalência viral, exibindo diferentes níveis de severidade nos acessos do BAG de abacaxi analisados.

Variedade	n	Níveis de severidade			
		0	1	2	3
Ananassóides	13	2 (23,08%)	2 (15,38%)	6 (46,15%)	2 (15,38%)
Bracteatus	18	1 (5,56%)	5 (27,78%)	10 (55,56%)	2 (11,11%)
Comosus	15	0 (0,00%)	9 (60,00%)	4 (26,67%)	2 (13,33%)
Erectifólius	5	0 (20,00%)	0 (0,00%)	1 (20,00%)	3 (60,00%)
Macrodonates	13	2 (23,08%)	5 (38,46%)	4 (30,77%)	1 (7,69%)
Total	64	7 (10,94%)	21 (32,81%)	25 (39,06%)	11 (17,19%)

0 = sem sintomas; 1 = pouco severo; 2 = severidade mediana; 3 = alta severidade.

No Havaí os acessos do Serviço de Pesquisa Agrícola (ARS) foram indexados para o PMWaV-1 e PMWaV-2. Verificou-se que mais de 85% dos acessos estavam infectados (SEETHER et al, 2001). Já no BAG da Embrapa, a grande maioria dos acessos estavam infectados com o PMWaV-1 (91%), enquanto que o PMWaV-2 foi detectado em 50% dos acessos. Foi constatado também que 40% dos acessos infectados possuíam infecção mista. Entre os acessos infectados, estavam as variedades botânicas Ananassoides, Erectifolius e Bracteatus, inclusive com origem brasileira (SEETHER et al., 2001).

Gambley et al. (2008) avaliaram a incidência viral em acessos de dois bancos de germoplasma, um da Estação de Pesquisa de Marrochy, MRS (Austrália) e outro do CIRAD (Martinica, França). Nos dois BAGs foram encontradas as três espécies de PMWaV, predominantemente em infecção mista, além da outra espécie o PMWaV-5 (GAMBLEY et al., 2008). De forma similar a este estudo, foi detectado o PMWaV-1, 2 e 3 em quatro variedades de *A. comosus* avaliadas, assim como uma planta da *A. comosus* var *paraguazensis* com PMWaV-1. Similar ao observado no Hawaii, a maior frequência de acessos contaminados no CIRAD foi com o PMWaV-1, enquanto que no MRS, o PMWaV-3 foi o vírus mais frequente.

As diferenças de prevalência das espécies de PMWaV observadas, tanto entre as variedades botânicas quanto entre os bancos de germoplasma (CNPMP, ARS, MRS, CIRAD) podem estar relacionadas a uma série de

fatores, com destaque para: i) relação vírus hospedeiro: melhor adaptação do vírus ao hospedeiro, que resulta em uma maior capacidade de replicação e movimentação viral. Conseqüentemente com maior titulação no tecido foliar e maior chance de ser adquirido pela cochonilha. ii) relação vírus-vetor: quando o vetor transmite uma espécie viral de forma mais eficiente que a outra, que por sua vez, pode estar combinada com a capacidade de replicação do mesmo; iii) relação vetor-planta: maior preferência das cochonilhas por algumas espécies e/ou variedades botânicas de abacaxi. Os resultados obtidos nesse trabalho mostram que o problema da murcha não está restrito às variedades cultivadas e que encontrar a fonte de resistência, demanda estudos mais aprofundados.

Outro problema que demanda solução é a alta ocorrência da murcha no BAG- abacaxi da Embrapa Mandioca e Fruticultura, o que enfatiza a necessidade de ações de limpeza e clonagem para o estabelecimento de duplicatas de segurança, sejam em bancos *in vitro*, em criobancos ou em telados antiafídicos.

Ocorrência de PMWAV em diferentes espécies de bromélias

Com a finalidade de saber se a presença do PMWaV se restringia apenas às espécies do gênero *Ananas*, foram analisadas sete espécies de bromélias do BAG de abacaxi do CNPMF, que são mantidas na mesma área com os abacaxis (Tabela 4).

Os resultados demonstram que os vírus responsáveis por causar a murcha do abacaxi não estão restritos ao gênero *Ananas*. Todas as espécies estudadas apresentaram alguma espécie viral e cinco espécies mostraram infecção mista, sendo quatro com infecção dupla (PMWaV-2 e PMWaV-3) e o acesso de *B. caratas* com a presença dos três vírus.

Uma diferença marcante em relação ao gênero *Ananas* foi a ausência do PMWaV-1 em seis espécies avaliadas e a ocorrência em *B. caratas* de uma infecção tripla. O PMWaV-2 e PMWaV-3 detectados em todas as variedades de abacaxi estavam ausentes em *Tillandsia sp.* e *Dickia sp.*, respectivamente. Não foram identificadas plantas de *B. Goeldiana*, *Tillandsia sp.* e *Dickia sp.* com infecções mistas.

A ocorrência de infecção mista deu-se principalmente com as espécies do PMWaV-2 e PMWaV-3, com ocorrência de 33,33% em *B. balansae*. Interessante observar que em espécies onde o PMWaV-1 é mais frequente, os outros dois (PMWaV-2 e PMWaV-3) são menos frequentes, tanto em *Ananas* como em bromélias.

Como ocorreu em *Ananas* a maior prevalência foi do PMWaV-2 com 44,44 % dos acessos infectados de forma simples e 27% por infecção mista. A presença dos PMWaVs em diferentes espécies de bromélias se configura um fato inédito e deverá abrir espaço para discussão em relação ao seu papel na disseminação do vírus.

Tabela 4 – Espécies de bromélias do BAG-Abacaxi da Embrapa, avaliadas para ocorrência das espécies do PMWaV.

Espécie	n° de acessos infectados/estados	PMWaV-1	PMWaV-2	PMWaV-3	PMWaV-1/PMWaV-2	PMWaV-1/PMWaV-3	PMWaV-2/PMWaV-3	PMWaV-1-2-3
<i>B. balansae</i>	6/6 (100)	0 (0,0)	3 (50)	1 (16,6)	0 (0,0)	0 (0,0)	2 (33,33)	0 (0,0)
<i>Bilbergia</i> sp.	2/2 (100)	0 (0,0)	1 (50)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (50,0)	0 (0,0)
<i>B. caratas</i>	1/1 (100)	0(00,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	1(100)
<i>Dickia</i> sp.	1/1 (100)	0 (0,0)	1 (100)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
<i>B.goeldiana</i>	4/4 (100)	0 (0,0)	1 (25)	3 (75)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
<i>B. laciniosa</i>	1/1 (100)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	1(100)	0 (0,0)
<i>Tillandsia</i> sp.	3/1(33,3)	0 (0,0)	0 (0,0)	2 (66,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
Total	18/16 (88,88)	0(00,0)	6(33,33)	6(33,33)	0 (0,0)	0 (0,0)	4(23,52)	1(5, 55)

REFERÊNCIAS

COPPENS D'EECKENBRUGGE, G.; LEAL, F. Morphology, anatomy and taxonomy. In: BARTHOLOMEW, D.P.; PAULL, R.E.; ROHRBACH, K.G. (Ed.) **The pineapple: botany, production and uses**. CAB International, p.13-32, 2003.

GIVNISH, T. J.; MILLIAM, K. C.; BERRY, P. E.; SYTSMA, K. J. Phylogeny, adaptive radiation, and historical biogeography of Bromeliaceae inferred from ndhF sequence data. **Aliso**, v. 23, p.3-26, 2007.

GIVNISH, T. J.; BARFUSS, M. H.; EE, B. V.; RIINA, R.; SCHULTE, K.; HORRES, R.; GONSISKA, P. A.; JABAILY, R. S.; CRAYN, D. M.; SMITH, J. A.; WINTER, K.; BROWN, G. K.; EVANS, T. M.; HOLST, B. K.; LUTHER, H.; TILL, W.; ZIZKA, G.; BERRY, P. E.; SYTSMA, K. J. Phylogeny, adaptive radiation, and historical biogeography in Bromeliaceae: Insights from an eight-locus plastid phylogeny. **American Journal of Botany**, v. 98, p. 872-895, 2011.

GUAMBLEY, A. B. C.; STEELE, A. D. W. GEERING, A. D. W.; THOMAS, J.E. The genetic diversity of ampeloviruses in Australian pineapples and their association with mealybug wilt disease. **Australasian Plant Pathology**, Australia, v.37, p. 95-105, 2008.

LEME, E. M. C.; SIQUEIRA FILHO, J. A. Taxonomia das bromélias dos fragmentos de Mata Atlântica de Pernambuco e Alagoas. In: SIQUEIRA FILHO, J. A.; LEME, E. M. C. **Fragmentos de Mata Atlântica do Nordeste**. Rio de Janeiro, p. 190-381, 2006.

MACHADO, C. F.; SOUZA, F. V. D.; CABRAL, J. R. S.; SOUZA, E. H. Estado da arte do Banco Ativo de Germoplasma de Abacaxi da Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MELHORAMENTO DE PLANTAS. Guarapari. **O melhoramento e os novos cenários da agricultura**. Guarapari: SBMP, 2009.

MELZER, M.J., SETHER, D.M., KARASEV, A.V., BORTH, W. and HU, J.S. Complete nucleotide sequence and genome organization of Pineapple mealybug wilt-associated virus-1. **Archives of Virology**, Hawaii, v. 153, p. 707-714, 2008.

SCHLOTZHAUER, S. C.; LITTELL, R. C.; **SAS- System for elementary Statistical Analysis**. 2 ed, 1997, 496 p.

SETHER, D. M. ; MELZER, M. J. ; BUSTO, J. ; ZEE, F. ; HU, J. S. Diversity and mealybug transmissibility of ampeloviruses in pineapple. *Plant Disease*, Hawaii, v. 89, p. 450- 456, 2005.

SETHER, D. M.; KARASEV, A. V.; OKUMURA, C.; ARAKAWA, C.; ZEE F.; KISIAN, M. M.; BUSTO, J.L.; HU, J. S. Differentiation, distribution and elimination of two different pineapple mealybug wilt-associated viruses found in pineapple. **Plant Disease**, Hawaii, v.85, n.8, p. 856–864, 2001.

SETHER, D. M.; MELZER, M. J.; BORTH, W. B.; HU, J. S. Genome organization and phylogenetic relationship of Pineapple mealybug wilt associated virus-3 and other family Closteroviridae members. **Virus Genes**, Hawaii, v. 38, p. 414-420, 2009.

SMITH, L. B.; DOWNS, R. J. Bromelioides (Bromeliaceae). **Flora Neotropica Monograph**, v. 14, n. 3, p. 1493-2141, 1979.

SMITH, L. B. Geographical evidence on the lines of evolution in the Bromeliaceae. **Botanische Jahrbücher für Systematik Pflanzengeschichte und Pflanzengeographie**, v. 66, p. 446-448, 1934.

CAPÍTULO 2

PREVALÊNCIA DO *Pineapple mealybug wilt-associated virus*, (PMWaV) EM NOVE ESTADOS BRASILEIROS

Capítulo formatado de acordo com a Revista Brasileira de Fruticultura

RESUMO

Santos, K.C. Prevalência do *Pineapple mealybug wilt-associated virus* (PMWaV) em nove estados brasileiros.

O *Pineapple mealybug wilt-associated virus* (PMWaV) é o agente etiológico da Murcha do abacaxi, doença que causa perdas significativas à cultura do abacaxizeiro. Atualmente, acredita-se que a doença é causada por um complexo viral composto pelo PMWaV-1, PMWaV-2 e PMWaV-3, que pertencem ao gênero *Ampelovirus*, família *Closteroviridae*. Os vírus são transmitidos por duas espécies de cochonilha, a *Dysmicoccus brevipes* e *D. neobrevipes*. A planta infectada apresenta perda de turgescência dos tecidos foliares e partes suculentas, fazendo-a definhar progressivamente, podendo levá-la à morte. O fato do abacaxizeiro ser propagado vegetativamente e em alguns casos as plantas contaminadas não apresentarem sintomas, pode levar à disseminação da doença dentro e entre regiões produtoras. Diante disso, o objetivo deste trabalho, foi gerar dados sobre a ocorrência e prevalência das espécies de PMWaV em abacaxizeiros provenientes de regiões produtoras de dez estados brasileiros. As análises foram feitas utilizando-se a técnica de RT-PCR. Os resultados demonstraram que as três espécies de PMWaV ocorrem em praticamente todas as regiões amostradas. O PMWaV-2 foi a espécie viral com maior frequência nas amostras infectadas e o único detectado em todas as regiões. A ocorrência de plantas com infecção mista foi comum. Entre as variedades cultivadas, a maior incidência do PMWaV foi Pérola. A análise de sequências parciais de nucleotídeos dos isolados selecionados, mostraram uma elevada conservação entre isolados da mesma espécie, porém baixa similaridade entre isolados de espécies diferentes.

Palavras-chave: Murcha; *Dysmicoccus brevipes*; PMWaV

ABSTRACT

Santos, K.C. Prevalence of *Pineapple mealybug wilt-associated virus* (PMWaV) in nine Brazilian states.

The *Pineapple mealybug wilt-associated virus*, PMWaV is the etiological agent of a disease that causes significant losses to the culture of the pineapple, popularly called "wilt of pineapple". Currently it is believed that the disease is caused by a virus complex, being characterized the PMWaV-1, PMWaV-2 and PMWaV-3, belonging to the genus *Ampelovirus*, family *Closteroviridae*. The viruses are transmitted by two species of mealybug, the *Dysmicoccus brevipes* and *D. neobrevipes*. The infected plant shows loss of turgor of leaf tissues and juicy parts, making it progressively wilt and may lead plant to death. The fact that the pineapple is propagated vegetatively, and in some cases the infected plants do not develop symptoms, can lead to the spread of disease within and between regions. Thus, the aim of this study was to generate data on the occurrence and prevalence of PMWaV species in pineapple producing regions from ten Brazilian states. The virus was detected using RT-PCR technique. The results showed that the three species of PMWaV occur in virtually all regions sampled. The PMWaV-2 was more frequently in infected samples, and the only detected in all regions. The occurrence of plants with mixed infection was common. Among the varieties cultivated the highest incidence was found in "Perola". The analysis of partial nucleotides sequences of selected isolates showed high conservation between isolates of the same species, but a low similarity between isolates of different species.

Keywords: Pineapple wilt; *Dysmicoccus brevipes*; PMWaV.

INTRODUÇÃO

O abacaxizeiro (*Ananas comosus* L. Merrill), se constitui na sexta fruteira tropical mais explorada economicamente no mundo, alcançando uma produção de 19 milhões de toneladas em 2008, sendo produzido principalmente no Brasil, Tailândia, Filipinas, Costa Rica, China e Índia (FAO, 2010). A produção brasileira de abacaxi está em expansão, produzindo em 2011 1,576 milhões de frutos em uma área de 62. 481 hectares (IBGE, 2011). Entretanto, a produtividade média brasileira ainda é baixa, variando de 20 t/ha à 35 t/ha, enquanto que outros países produtores apresentam de 45 t/há à 55 t/há.

A murcha do abacaxizeiro foi descrita pela primeira vez no Havaí em 1900. Inicialmente, acreditava-se que a doença era causada por cochonilhas que colonizam a planta (CARTER, 1933). Pesquisas posteriores detectaram um segundo agente envolvido na etiologia da doença (SINGH e SASTRY, 1974). Na década de 80, foram identificadas partículas virais em plantas sintomáticas (GUANASINGHE e GERMAM, 1986, 1987). O vírus associado à murcha do abacaxi foi denominado PMWaV, *Pineapple mealybug wilt-associated virus* (GERMAN et al., 1992). Apesar de ter uma causa viral, os sintomas da murcha só se manifestam, quando a planta infectada pelo vírus, também está sendo colonizada pela cochonilha vetora (SETHER e HU, 2002).

Atualmente, acredita-se que a doença é causada por um complexo viral composto pelo PMWaV-1, PMWaV-2 e PMWaV-3. As três espécies virais pertencem a família *Closteroviridae*, gênero *Ampelovirus* e se diferenciam pela sequência e organização do genoma (SETHER et al., 2001, MELZER et al., 2008; SETHER et al., 2009).

A murcha está presente atualmente nas principais regiões produtoras de abacaxi do Brasil e do mundo (SETHER, et al., 2001; GAMBLEY et al., 2008). No Brasil, a doença tem aumentado consideravelmente nos últimos anos, causando em média perdas acima de 30% nos estados produtores como o Espírito Santo, Paraíba e Bahia, chegando a casos de 70 a 90% (SANCHES e DIAMANTINO, 1997; VENTURA e ZAMBOLIM, 2002). Embora haja o registro dos danos gerados pela murcha, informações a respeito da prevalência das espécies de PMWaV em regiões produtoras são extremamente escassas, com

relatos feitos na Bahia (SANTOS e ANDRADE, 2009; SANTOS et al., 2010) e Espírito Santo (PERON et al., 2009).

Diante disso, o objetivo deste trabalho foi analisar a prevalência das espécies do PMWaV, em amostras de abacaxizeiros provenientes de cultivos localizados em diferentes estados brasileiros.

MATERIAIS E MÉTODOS

Coleta das amostras

As amostras foliares foram coletadas em plantios comerciais de abacaxizeiro localizados em nove estados brasileiros: Minas Gerais (5), Mato Grosso (6), Paraná (4), Rio Grande do Sul (4), Pará (3), Paraíba (8), Bahia (7) e divisa entre Rio de Janeiro e Espírito Santo (4). As amostras foram coletadas de plantas sintomáticas. Após a coleta, as amostras foram armazenadas em sacos plásticos e transportadas para o Laboratório de Virologia da Embrapa Mandioca e Fruticultura para serem testadas.

Tabela 1- Origem das amostras de abacaxizeiros com sintomas de murcha do abacaxi coletadas nas nove regiões do Brasil.

Cidade/Estado	Nº de amostras	Cultivar
Itaberaba-BA	1	Pérola
Itaberaba- BA	1	Pérola
Canápolis-MG	1	Smooth Cayenne
Canápolis-MG	1	Smooth Cayenne
Canápolis-MG	1	Smooth Cayenne
Canápolis-MG	1	Smooth Cayenne
Canápolis-MG	1	Smooth Cayenne
Invinhema-MS	1	Smooth Cayenne
Invinhema-MS	1	Smooth Cayenne
Invinhema-MS	1	Smooth Cayenne
Itaporã-MS	1	Smooth Cayenne
Itaporã-MS	1	Smooth Cayenne
Itaporã-MS	1	Smooth Cayenne
Santa Isabel do Ivaí-PR	1	Smooth Cayenne

Santa Isabel do Ivaí-PR	1	Smooth Cayenne
Santa Isabel do Ivaí-PR	1	Smooth Cayenne
Santa Isabel do Ivaí-PR	1	Smooth Cayenne
Terra de Areia-RS	1	Pérola
Terra de Areia-RS	1	Pérola
Terra de Areia-RS	1	Pérola
Terra de Areia-RS	1	Pérola
Vila São Marcos-PA	1	Pérola
Vila São Marcos-PA	1	Pérola
Vila São Marcos-PA	1	Pérola
Distrito de Mituaçu-PB	1	Pérola
Distrito de Mituaçu-PB	1	Pérola
Distrito de Mituaçu-PB	1	Pérola
Distrito de Mituaçu-PB	1	Pérola
Município de Itapororoca-PB	1	Pérola
Município de Itapororoca-PB	1	Pérola
Município de Santa Rita-PB	1	Pérola
Salvaterra	1	Pérola
Porto Seguro- BA	1	Imperial
Porto Seguro- BA	1	Imperial
Porto Seguro- BA	1	Imperial
Porto Seguro- BA	1	Imperial
Porto Seguro- BA	1	Imperial
Divisa RJ/ES	1	Pérola
Divisa RJ/ES	1	Pérola
Divisa RJ/ES	1	Pérola
Divisa RJ/ES	1	Pérola

Extração do RNA total

A extração do RNA total foi realizada com o auxílio do reagente Trizol® (Invitrogen), de acordo com as indicações do fabricante. Cerca de 100 mg de tecido da folha foram coletados, macerados em nitrogênio líquido e transferidos para microtubos de 1,5 mL. Foi adicionado 1mL de reagente Trizol® e as amostras homogeneizadas. Em seguida, adicionou-se 250 µL de clorofórmio, as amostras foram agitadas por 15 segundos e incubadas no gelo por 5 minutos. Posteriormente, procedeu-se uma centrifugação a 12,000 x g por 15 minutos a 4°C. O sobrenadante foi transferido para novos tubos e adicionados 500 µL de álcool isopropílico. As amostras foram incubadas novamente por 2 minutos no gelo e, posteriormente, centrifugados a 12.000 r.p.m por 20 minutos a 4°C. O sedimento obtido foi lavado com etanol 75% e depois diluído em 30 µL de água livre de nucleases. As amostras foram conservadas a -80°C.

Deteccção das espécies do PMWaV por RT-PCR (Transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase).

A transcrição reversa (RT) consistiu de duas etapas consecutivas. Durante a primeira, foram adicionados em um microtubo: 5 µg de RNA total, 2 pmol de hexâmeros de sequência aleatória e água livre de nucleases, completando o volume para 12 µL. A amostra foi incubada por 3 min a 70°C e, transferida imediatamente para o gelo. Na segunda etapa foram adicionados ao microtubo: 4 µL do tampão da reação, 2µL de ditionotretol (DTT) 0,1M, 1µL da mistura de dNTPs a 10 mM; 1µL (200 U) da enzima transcriptase reversa (M-MLV, Invitrogen). A reação final foi incubada a 37°C por 1 h e em seguida a 70°C por 10 min.

A região genômica HSP 70, foi amplificada via Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), com o auxílio de primers específicos para o PMWaV-1, PMWaV-2 e PMWaV-3 (Tabela 3). Acrescentando 2,5 µL do cDNA, 5 µL do

tampão da PCR (200 mM Tris-HCl, pH 8.4, 500 mM KCl), 3 µL de MgCl₂ 25 mM, 1µL da mistura de dNTPs a 2,5 mM cada, 0,5 µL (1 U) da Taq Platinum DNA polimerase (Invitrogen), e 0,5 µM de cada oligonucleotídeo, e o volume da reação foi completado para 50 µL adicionando-se água livre de nuclease. O processo de amplificação consistiu de uma desnaturação inicial a 94 °C por 3 minutos, seguida de 35 ciclos que envolvem as etapas sequenciais de desnaturação (94 °C/ 45 s) e (94 °C/3 min), anelamento dos primers (48 °C/45 s) e extensão (72 °C/1 min). Os amplicons foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1%.

Tabela 2 - Sequência dos oligonucleotídeos utilizados nas reações, de acordo com Sether et al. (2001) e (2005).

Oligonucleotídeos	Sequências
PMWaV- 1 (F)	5' ACA GGA AGG ACA ACA CTC AC 3'
PMWaV- 1 (R)	5' CGC ACA AAC TTC AAG CAA TC 3'
PMWaV- 2 (F)	5' CAT ACG AAC TAG ACT CAT ACG 3'
PMWaV- 2 (R)	5' CCA TCC ACC AAT TTT ACT AC 3'
PMWaV- 3 (F)	5' AGT TCA CTG TAC ATT TCG GA 3'
PMWaV- 3 (R)	5' ATT GAT CGA TGT GTA TCG 3'

Sequenciamento e análise das sequências

Os produtos da PCR foram purificados e sequenciados diretamente, utilizando os mesmos primers da amplificação. A sequência consenso de cada isolado, foi obtido pelo alinhamento das sequências Forward e Reverse, geradas pelo programa Blastn (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). As sequências de nucleotídeos dos isolados virais foram analisadas, comparadas entre si e alinhadas utilizando o programa Clustal X (LARKIN et al., 2007).

Árvores filogenéticas foram construídas com o programa MEGA 5 (Tamura et al., 2005), usando o algoritmo de Neighbor-Joining com 1000 bootstrap de repetições.

Análise dos dados

Para os dados de ocorrência de vírus foram calculadas as frequências absolutas e relativas para cada local ou cultivar. As análises estatísticas foram realizadas com auxílio do programa estatístico SAS - Statistical Analysis System (SCHLOTZHAUER e LITTELL, 1997).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Apesar de diversos relatos na literatura sobre a ocorrência e perdas decorrentes da murcha do abacaxi em diversos estados brasileiros, poucos trabalhos buscaram identificar quais espécies de PMWaV estão presentes nas regiões produtoras brasileiras. Para obter a prevalência das espécies do PMWaV, amostras de plantas sintomáticas foram coletadas em nove regiões produtoras de abacaxi do Brasil. Estas amostras contemplaram as três principais variedades plantadas no Brasil atualmente: Smooth Cayene, Pérola e Imperial.

Os resultados da frequência viral estão na Tabela 1. A maioria das plantas (92,68%) estavam infectadas com o PMWaV. Observa-se que o PMWaV-2 é a espécie de vírus com maior prevalência, encontrado em 94,7% das plantas contaminadas. Além disso, esta presente em todas as regiões amostradas e em algumas delas, como no Distrito de Mituaçu-PB, Santa Rita-PB e Santa Isabel do Ivaí-PR foi a única espécie detectada.

Cabe ressaltar que a coleta de amostras foi focada em plantas que apresentavam sintomas da doença e que de acordo com Sether e Hu (2002), os sintomas são visíveis em plantas infectadas pelo PMWaV-2 e colonizadas pela cochonilha. Esta informação ajuda a explicar o fato desta espécie ter sido detectada em quase todas as amostras. Entretanto, em duas amostras provenientes de Canápolis-MG e Invinhema-MS foi detectado apenas o PMWaV-1. A associação entre a presença do PMWaV-1 e plantas com sintomas foi relatada também na Austrália (GAMBLEY et al., 2008). Neste estudo, os autores encontraram uma associação significativa entre a presença do PMWaV-1 e plantas sintomáticas. Constataram também, que plantas infectadas pelo PMWaV-3 expressavam os sintomas de murcha, concluindo que nas condições locais PMWaV-1 e -3 estavam mais associados a murcha do abacaxi que o PMWaV-2.

Tabela 1. Frequência (%) e nº de plantas (valor entre parênteses) de ocorrência das espécies de PMWaV por localidade analisada

Local	n*	Sem vírus	PMWaV-1	PMWaV-2	PMWaV-3	PMWaV-1/ PMWaV-2	PMWaV-1/ PMWaV-3	PMWaV-2/ PMWaV-3	PMWaV-1- 2-3	Ocorrência vírus/ estado
Porto Seguro -BA	5	40,0 (2)	0,0 (0)	20,0 (1)	0,00 (0)	0,00 (0)	0,0 (0)	0,0 (0)	40,0 (2)	1,2,3
Itaberaba-BA	2	0,0 (0)	0,0 (0)	0,0 (0)	0,00 (0)	50,0 (1)	0,0 (0)	50,0 (1)	0,0 (0)	
Canápolis-MG	5	0,0 (0)	20,0 (1)	20,0 (1)	0,00 (0)	40,0 (2)	0,0 (0)	0,0 (0)	20,0 (1)	1,2,3
Divisa RJ/ES	4	0,0 (0)	0,0 (0)	75,0 (3)	0,00 (0)	0,0 (0)	0,0 (0)	0,0 (0)	25,0 (1)	1,2,3
Itaporã-MS	3	0,0 (0)	0,0 (0)	0,0 (0)	0,00 (0)	33,3 (1)	0,0 (0)	0,0 (0)	66,6 (2)	1,2,3
Ivinhema -MS	3	0,0 (0)	33,3 (1)	33,3 (1)	0,00 (0)	0,0 (0)	0,0 (0)	0,0 (0)	33,3 (1)	
Santa Rita-PB	1	0,0 (0)	0,0 (0)	100,0 (1)	0,00 (0)	0,0 (0)	0,0 (0)	0,0 (0)	0,0 (0)	
Distrito de Mituaçu-PB	4	25,0 (1)	0,0 (0)	75,0 (3)	0,00 (0)	0,0 (0)	0,0 (0)	0,0 (0)	0,0 (0)	1,2
Itapororoca - PB	2	0,0 (0)	0,0 (0)	50,0 (1)	0,00 (0)	50,0 (1)	0,0 (0)	0,0 (0)	0,0 (0)	
Santa Isabel do Ivaí-PR	4	0,0 (0)	0,0 (0)	25,0 (1)	0,00 (0)	75,0 (3)	0,0 (0)	0,0 (0)	0,0 (0)	1,2
Terra de Areia-RS	4	0,0 (0)	0,0 (0)	75,0 (3)	0,00 (0)	0,0 (0)	0,0 (0)	25,0 (1)	0,0 (0)	2,3
Salvaterra-PA	1	0,0 (0)	0,0 (0)	0,0 (0)	0,00 (0)	0,0 (0)	0,0 (0)	100,0 (1)	0,0 (0)	1,2,3
Vila São Marcos-PA	3	0,0 (0)	0,0 (0)	33,3 (1)	0,00 (0)	0,0 (0)	0,0 (0)	0,0 (0)	66,6 (2)	
Total	41	7,3 (3)	4,8 (2)	39,0 (16)	0,00 (0)	19,5 (8)	0,0 (0)	7,3 (3)	21,9% (9)	

(*) Número de plantas

Tabela 2. Frequência percentual e absoluta (valor entre parenteses) de ocorrência das espécies de PMWaV por cultivar.

Cultivar	n*	Sem vírus	PMWaV-1	PMWaV-2	PMWaV-3	PMWaV-1/ PMWaV-2	PMWaV-1/ PMWaV-3	PMWaV-2/ PMWaV-3	PMWaV-1-2-3
Imperial	5	40,0 (2)	0,0 (0)	20,0 (1)	0,0 (0)	0,0 (0)	0,0 (0)	0,0 (0)	40,0 (2)
Pérola	21	4,7 (1)	0,0 (0)	57,1 (12)	0,0 (0)	9,5 (2)	0,0 (0)	14,2 (3)	14,2 (3)
Smooth Cayenne	15	0,0 (0)	13,3 (2)	20,0 (3)	0,0 (0)	40,0 (6)	0,0 (0)	0,0 (0)	26,6 (4)
Total	41	7,3 (3)	4,8 (2)	39,0 (16)	0,0 (0)	19,5 (8)	0,0 (0)	7,3 (3)	21,9 (9)

(*) Número de plantas

Ao total, cerca de 52,6% das plantas infectadas apresentaram infecção mista, sempre tendo o PMWaV-2 como parte integrante. A presença de infecção mista em regiões produtoras é esperada devido ao uso de mudas provenientes de plantios anteriores e a constantes trocas entre produtores, favorecendo a introdução e disseminação das três espécies. Esta pode ser devido as diferentes interações entre o vírus e o hospedeiro e/ou entre vírus e o vetor.

Interessante notar, que o levantamento feito em plantios no Havaí para a presença do PMWaV-1 e PMWaV-2, indicou uma elevada ocorrência do PMWaV-1 (91% das plantas infectadas), enquanto que o PMWaV-2 estava presente em 50% das infectadas (SEThER et al., 2001). Neste estudo, foi observado uma correlação de 100% entre a presença do PMWaV-2 e a exibição de sintomas. Similar ao trabalho realizado na Austrália, também foi encontrado elevada incidência do PMWaV-1 e menor incidência do PMWaV-2 em plantios comerciais. Ainda mais, nestas áreas foi encontrado uma elevada ocorrência do PMWaV-3 (GAMBLEY et al., 2008). Ao contrário do observado no Havaí, a presença de plantas sintomáticas estava associada ao PMWaV-1 e PMWaV-3.

Quando analisadas as frequências em relação a cultivar, as que apresentaram maiores valores para as três espécies foram a Pérola e Smooth Cayenne (Tabela 2). Uma provável explicação para estes dados é o maior tempo no mercado que estas duas cultivares tem em relação a cultivar Imperial. Como o abacaxi é plantado utilizando muda de plantios anteriores, o maior tempo de mercado do Pérola e Smooth Cayenne deve ter possibilitado uma maior ocorrência de mudas infectadas em comparação ao Imperial. Este fato pode ser reforçado pelo fato de 40% das amostras da variedade Imperial se apresentar livre do vírus.

Com o intuito de obter informações genéticas sobre as espécies do PMWaV, foi amplificada uma região do genoma viral que codifica uma sequência homóloga à proteína de choque térmico, ou Hsp70, utilizando tanto primers específicos quanto degenerados. Foram sequenciados 13 isolados, sendo um do PMWaV-1 (PCR com primers específicos), oito do PMWaV-2

(PCR com primers degenerados) e três do PMWaV-3 (PCR com primers específicos). A comparação das sequências geradas com as do banco de dados (GeneBank) confirmou a identidade de cada isolado (Tabela 3). Além disso, apenas isolados da mesma espécie apresentam elevada conservação entre suas sequências de nucleotídeos (Tabela 3). Enquanto os isolados de PMWaV-3 compartilham uma identidade acima de 97,5% entre eles, este valor não ultrapassa 70% com o PMWaV-2 e de 78,7% com PMWaV-1. De forma similar, os isolados de PMWaV-2 compartilham identidade superior a 87%, com exceção dos isolados 192 e 193, cuja identidade foi de 82,8%.

Tabela 3. Percentual de identidade existente entre as sequências nucleotídicas da Hsp70 entre os isolados das três espécies de PMWaV.

isolados	138	140	142	PMWaV 3	187	188	189	190	191	192	193	196	197	PMWaV 2	195	PMWaV 1
138	-	99,5	100	97,5	68,6	68,6	68,9	68,9	68,9	69,4	67,9	68,6	68,6	67,1	78,7	75,4
140		-	99,5	96,9	68,6	68,6	68,9	68,9	68,9	69,4	67,9	68,6	68,6	67,1	78,7	75,7
142			-	97,5	68,6	68,6	68,9	68,9	68,9	39,4	67,9	68,6	68,6	67,1	78,7	75,7
PMWaV 3				-	69	69	69,3	69,3	69,3	69,9	67,7	69	69	67,6	78,5	75,5
187					-	99,5	99,8	99,3	99,5	88,1	89,6	99,8	99,8	97,7	64,2	62,3
188						-	99,3	98,8	99,1	87,7	89,1	99,3	99,3	97,2	64,2	62,3
189							-	99,1	99,3	87,9	89,3	99,5	99,5	97,4	64,4	63,2
190								-	99,8	87,9	90,2	99,5	99,5	97,4	64,7	63,4
191									-	88,1	90	99,8	99,8	97,7	64,7	63,4
192										-	82,8	88,3	88,3	88,8	64,4	62,9
193											-	89,8	89,8	90,8	64,5	63,7
196												-	100	97,1	64,4	63,2
197													-	97,1	64,4	63,2
PMWaV 2														-	64,9	63,6
195															-	91,6
PMWaV 1																-

Nº de acesso no GeneBank - PMWaV 1 (AF414119), PMWaV-2 (AF283103) e PMWaV-3 (EF488755)

As sequências geradas foram alinhadas e o resultado do alinhamento foi utilizado para a construção de uma árvore filogenética. Como esperado, os isolados formaram três ramificações, cada uma contendo isolados de uma espécie de PMWaV (Figura 1).

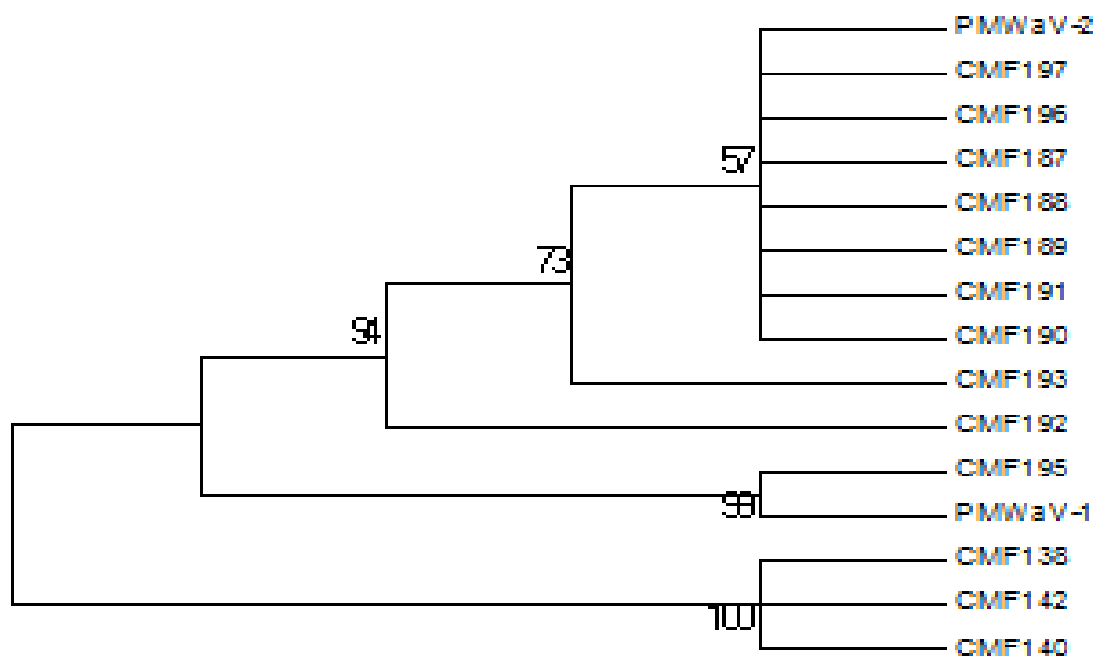


Figura 1. Árvore filogenética obtida a partir do alinhamento da sequência parcial de nucleotídeos do gene HSP70 dos isolados das espécies de *Pineapple mealybug-associated virus* (PMWaV-1, -2 e -3). Foi utilizado o programa Mega 5.0 (TAMURA et al., 2005), método “Neighbor-Joining” e bootstrap com 1000 repetições.

A presença das espécies de PMWaV está distribuída pelas regiões produtoras amostradas, com maior predomínio do PMWaV-2. Novos levantamentos são necessários, incluindo amostras de plantas sintomáticas e assintomáticas para obter-se a estimativa real da prevalência viral nos plantios de abacaxi e buscar correlacionar espécies presente, associadas como sintomas de murcha observados no campo.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Houve uma prevalência significativa das espécies do PMWaV, em todas as variedades botânicas do gênero *Ananas* e também na espécie *A macrodontes*.

O registro da presença das espécies do PMWaV em bromélias, foi uma contribuição relevante obtida nesse trabalho, isso porque elas são bastante comercializadas como plantas ornamentais e podem ter papel na disseminação do vírus.

A presença do vírus em todas as regiões produtoras de abacaxi demonstrou a necessidade de adoção de medidas preventivas, a fim de frear a disseminação do vírus e assim reduzir as perdas na produção.

Os estudos realizados no BAG deverão ser ampliados, envolvendo maior número de acessos com plantas assintomáticas e que estejam com a presença da cochonilha.

REFERÊNCIAS

CARTER, W. The pineapple mealy bug, *Pseudococcus brevipes*, and wilt of pineapples. **Phytopathology**, v. 23, p. 207-242, 1933.

CARTER, W. Mealybug wilt and green spot in Jamaica and Central America. **Phytopathology**, v. 24, p. 424-426, 1934.

FAO- **Food and Agriculture Organization** (2011) < <http://www.fao.org>> (15/07/2013).

GUAMBLEY, A. B. C.; STEELE, A. D. W. GEERING, A. D. W.; THOMAS, J.E. The genetic diversity of ampeloviruses in Australian pineapples and their association with mealybug wilt disease. **Australasian Plant Pathology**, Australia, v.37, p. 95-105, 2008.

GERMAN, T. L.; ULLMAN, D.E.; GUNASHINGHE, U. B. Mealybug wilt of pineapple. **Advances Disease Vector Research**, v. 9, p. 241-259, 1992.

GUNASINGHE, U.B.; GERMAN, T.L. Association of virus particle with mealybug wilt of pineapple. **Phytopathology**, v.76, p.1073, 1986 (Abstr.)

GUNASINGHE, U.B.; GERMAN, T.L. Further characterization of a virus associated with mealybug wilt of pineapple. **Phytopathology**, v.77, p.1776, 1987 (Abstr.)

GUNASINGHE, U.B.; GERMAN, T.L. Purification and partial characterization of a virus from pineapple. **Phytopathology**, v.79, n.12, p.1337-1341, 1989.

HU, J. S.; SETHER, D. M.; LIU, X. P.; WANG, M.; ZEE. F.; ULLMAN, D. Use of a tissue blotting immunoassay to examine the distribution of pineapple mealybug wilt-associated virus in Hawaii. **Plant Disease**, v. 81, p.1150-1154, 1997.

IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Culturas temporárias e permanentes. **Produção Agrícola Municipal**, Rio de Janeiro, v. 38, p.1-97, 2011.

LARKIN, M. A.; BLACKSHIELDS, G.; BROWN, N. P.; CHENNA, R.; MCGETTIGAN, P. A.; MCWILLIAM, H.; VALENTIN, F.; WALLACE, I. M.; WILM, A.; LOPEZ, R.; THOMPSON, J. D.; GIBSON, T. J.; HIGGINS, D. G. Clustal W and Clustal X version 2.0. **Bioinformatics**, v. 23, p. 2947-2948, 2007.

MELZER, M.J.; SETHER, D.M.; KARASEV, A.V.; BORTH, W.; HU, J.S. Complete nucleotide sequence and genome organization of Pineapple mealybug wilt-associated virus-1. **Archives of Virology**, v.153, p.707-714, 2008.

MELZER, M. J.; KARASEV, A. V.; SETHER, D. M.; HU, J. S. Nucleotide sequence, genome organization, and phylogenetic analysis of pineapple mealybug wilt-associated virus- 2. **General Virology**, v. 82, p.1-7. 2001.

PERON, FN, FERNANDES, P. M.B.; VENTURA, J. A. Detecção de PMWaV-1 e PMWaV-2 em abacaxizeiros no Estado do Espírito Santo. **Tropical Plant Pathology (Suplemento)**,v.34, p. 268, 2009.

SANCHES, N.F.; DIAMANTINO, E.P (1997) Índices de infestação da cochonilha *Dysmicoccus brevipes* (Hemiptera: Pseudococcidae) em abacaxizeiro sob regime de irrigação. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA, 16., 1997, Salvador, BA. Resumos. Salvador, BA: Sociedade Entomológica do Brasil, p.220, 1997.

SANTOS, K.C.; ANDRADE, E. C (2009). Detecção do vírus que causa a murcha do abacaxi por meio de RT-PCR, utilizando primers específicos e degenerados. Anais, 3ª Jornada Científica da Embrapa Mandioca e Fruticultura, Cruz das Almas, BA, disponível em:

http://www.cnpmf.embrapa.br/publicacoes/jornada/resumos/Resumo_KeilaCS_EduardoCA_rev_JR_ED_.pdf

SANTOS, K. C.; FIUZA, A. S.; Andrade, E. C. (2010). Incidência do *Pineapple mealybug wilt associated virus*, PMWaV no Banco Ativo de Germoplasma de abacaxi in vitro da Embrapa Mandioca e Fruticultura. Anais, 4ª Jornada Científica da Embrapa Mandioca e Fruticultura, Cruz das Almas, BA, disponível em:

http://www.cnpmf.embrapa.br/publicacoes/jornada_2010/resumos/PROTECAO%20DE%20PLANTAS/094_Keila_Eduardo_.pdf

SCHLOTZHAUER, S. C.; LITTELL, R. C.; **SAS- System for elementary Statistical Analysis**. 2 ed, 1997, 496 p.

SETHER, D.M.; KARASEV, A.V.; OKUMURA, C.; ARAKAWA C.; ZEE, F.; KISLAN, M.; BUSTO, J.; HU, J.S. Differentiation, distribution, and elimination of two different pineapple mealybug wilt-associated viruses found in pineapple. **Plant Dis.**, v. 85, p. 856–864, 2001.

SETHER, D. M, HU, J. S. Closterovirus infection and mealybug exposure are necessary for the development of mealybug wilt of pineapple disease. **Phytopathology**, v.92, p. 928–935, 1997.

SETHER, D. M.; HU, J.S. Closterovirus infection and mealybug exposure are necessary for the development of mealybug wilt of pineapple disease. **Phytopathology**, v. 92, p. 928–935, 2002.

SETHER, D.M., MELZER, M.J.; HU, J.S. Pineapple mealybug wilt associatedviruses 1, 3, and 4, and Grapevine leafroll associated viruses 4, 5, 6, and 9 are a distinct group in the genus Ampelovirus. **Abstract...**Proceedings XIII International Congress of Virology, 2005.

SETHER, D.M.; MELZER, M.J.; BORTH, W.B; HU, J.S. Genome organization and phylogenetic relationship of Pineapple mealybug wilt associated virus-3 with family Closteroviridae Members. **Virus Genes**, v. 38, p.414–420, 2009.

SINGH, S.; SASTRY, K. S. M. Wilt of pineapple – a new virus disease in India. **Indian Phytopathology**, v. 27, p. 298-303, 1974.

TAMURA, K.; PETERSON, D.; PETERSON, N.; STECHER, G.; NEI, M.; e KUMAR, S. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. **Molecular Biology and Evolution**, v. 28, p. 2731-2739, 2005.

Wakman, W.; Teakle, D. S.; Thomas, J. E.; Dietzgen, R. G. Presence of a clostero-like virus and a bacilliform virus in pineapple plants in Australia. **Aust. J. Agric. Res.** V. 46, p. 947-958, 1995.

VENTURA, J.A.; ZAMBOLIM, L. Controle das doenças do abacaxizeiro. In: ZAMBOLIM, L.; VALE, F. X. R. do; MONTEIRO, A. J. A.; COSTA, H. (Org.). Controle de doenças de plantas frutíferas. Viçosa, v.1, p. 445-509,2002.

plant disease

First Report of Pineapple mealybug wilt-associated virus infecting *Bromelia laciniosa* in Brazil.

Journal:	<i>Plant Disease</i>
Manuscript ID:	Draft
Manuscript Type:	Plant Disease Note
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Santos, Keila; Federal University of Reconcavo da Bahia, Souza, Fernanda; Brazilian Agricultural Research Company (Embrapa Cassava & Fruits), Andrade, Eduardo; Brazilian Agricultural Research Company (Embrapa Cassava & Fruits),
Keywords:	Viruses and viroids < Causal Agent, Ornamentals < Crop Type, Tropical plants < Crop Type

1
2
3
4 **First Report of Pineapple mealybug wilt-associated virus infecting *Bromelia***
5 ***laciniosa* in Brazil.**
6

7
8 **K. C. Santos¹, F. V. D. Souza² and E. C. Andrade²** (1) Federal University of
9 Reconcavo da Bahia, 44380-000, Cruz das Almas-BA, Brazil; (2) Brazilian Agricultural
10 Research Company (Embrapa Cassava & Fruits), 44380-000, Cruz das Almas-BA,
11 Brazil
12
13

14
15
16 The *Bromeliaceae* family comprises species with commercial value, both as food and as
17 an ornamental. The well known specie is the pineapple (*Ananas comosus* var. *comosus*).
18 In addition, several species are widely used as an ornamental crop. *Pineapple mealybug*
19 *wilt-associated virus* (PMWaV) is a virus-complex that infects pineapple causing
20 disease popularly named Mealybug Wilt of Pineapple (MWP). In July 2013, a single
21 plant of bromeliad specie *Bromelia laciniosa*, maintained at the Brazilian Pineapple
22 Germplasm (located at Embrapa Cassava & Fruits, Cruz das Almas, Bahia State, Brazil)
23 exhibit typical symptoms of PMWaV infection. The plant exhibited loss of leaf
24 turgidity, dry ends, redness and yellowing of leaves. The plant was close to
25 symptomatic pineapple plants, thus we investigate the presence of PMWaV in this
26 plant. Leaves from the central part of the plant were collected and total RNA extracted
27 from the basal white leaf tissue using Trizol[®] (Invitrogen). The cDNA synthesis was
28 made using Superscript III (Invitrogen) and random primers. The PCR was carried out
29 using specific primer sets for PMMaV-1, 2 and 3 (1). The RT-PCR results detected a
30 simultaneously presence of PMWaV-2 and PMWaV-3 in the plant. To confirm the
31 identity of these sequences, the amplicons obtained for PMWaV-2 (609pb) and
32 PMWaV-3 (495pb) were purified, sequenced in both direction, manually edited to get
33 the consensus sequences. Comparative analysis with GenBank sequences confirmed the
34 specificity of the amplification, with the amplicons sharing 99% and 98% nucleotide
35 identity with the fully characterized PMWaV-2 (AF283103), and PMWaV-3
36 (EF488755), respectively.
37

38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
The occurrence of PMWaV in bromeliad specie is unprecedented and opens space for
discussion in relation to its role as a source of spreading the virus. For this reason, it's
important to address if other species, mainly those widely used as ornamentals, may
also be host for the PMWaV virus complex.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

References: (1) D.M. Sether et al. Plant Disease v. 89, p. 450- 456, 2005.

Supplemental Material



A- *Bromelia laciniosa* exhibiting symptoms of Mealybug Wilt of Pineapple (MWP), caused by the Pineapple mealybug wilt-associated virus (PMWaV). B- Healthy leaf (left) and leaves showing redness (middle) and tip dry (right).