



**ANTONIO ROBERTO GOMES DE FARIAS**

**DIAGNOSE E CARACTERIZAÇÃO  
MOLECULAR DE ESPÉCIES DE *Badnavirus*  
QUE CAUSAM A ESTRIA DA BANANEIRA NO  
BRASIL**

**LAVRAS - MG**

**2016**

**ANTONIO ROBERTO GOMES DE FARIAS**

**DIAGNOSE E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE ESPÉCIES DE  
*Badnavirus* QUE CAUSAM A ESTRIA DA BANANEIRA NO BRASIL**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração em Fitopatologia para a obtenção do título de Mestre.

Orientadora

Dra. Antonia dos Reis Figueira

**LAVRAS - MG**

**2016**

**Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha  
Catalográfica da Biblioteca Universitária da UFLA, com dados  
informados pelo(a) próprio(a) autor(a).**

Farias, Antonio Roberto Gomes de.

Diagnose e caracterização molecular de espécies de *Badnavirus* que causam a estria da bananeira no Brasil / Antonio Roberto Gomes de Farias. – Lavras: UFLA, 2016.

55 p.

Dissertação (mestrado acadêmico)–Universidade Federal de Lavras, 2016.

Orientador(a): Antonia dos Reis Figueira.

Bibliografia.

1. *Badnavirus*. 2. RCA. 3. *Banana streak virus*. 4. RT/RNaseH. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

**ANTONIO ROBERTO GOMES DE FARIAS**

**DIAGNOSE E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE ESPÉCIES DE  
*Badnavirus* QUE CAUSAM A ESTRIA DA BANANEIRA NO BRASIL**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração em Fitopatologia para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 25 de fevereiro de 2016.

Dra. Sttela Dellyzete Veiga Franco da Rosa      Embrapa Café

Dra. Priscilla e Sousa Geraldino Duarte      UFLA

Dra. Antonia dos Reis Figueira  
Orientadora

**LAVRAS - MG**

**2016**

## AGRADECIMENTOS

Ao Criador, por me conceder a vida, por me proporcionar a oportunidade de estudar, o aprendizado e conhecer pessoas que somaram tanto em minha vida.

Aos meus pais, Raimundo Gomes de Farias e Maria do Carmo Gomes de Farias, pelo alicerce formado, pelo incentivo para nunca desistir e focar em meus objetivos, proporcionando que eu chegasse até esse momento e batalhasse pelos meus sonhos.

Aos meus irmãos, Ronaldo, Marineide, Marileide, Ronildo, Marlene, Marilene, Rodrigo e Macilene, pelos momentos de alegrias e tristezas, pela amizade, amor, apoio, carinho e risadas quando estamos juntos e por entenderem minha ausência.

Ao meu mestre, professor João Araújo, da UFRRJ, por ter aguçado minha curiosidade e me inserido na pesquisa científica, mostrando o valor de cada descoberta.

Ao grande amigo Maruzanete Pereira, pela amizade e pelo apoio e incentivo constante.

À Universidade Federal de Lavras (UFLA), por meio do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitopatologia, por ter me proporcionado a oportunidade de realizar o mestrado.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudos.

À minha orientadora, professora Antônia dos Reis Figueira, por todo ensinamento, consideração e confiança.

A todos os professores que contribuíram para a minha formação até hoje.

Às *D.Sc.* Priscilla de Sousa Geraldino Duarte e Suellen Galvino Costa, pelo acompanhamento, instrução, atenção e disponibilidade em todas as etapas da execução do trabalho.

Aos produtores e pesquisadores da área da bananicultura, em especial Dr. José Aires Ventura (INCAPER), Dr. Luiz Carlos Salomão (UFV) e Dr. Luiz Aurélio Peres Martelletto (UFRRJ), pelo envio de amostras.

Aos meus colegas de laboratório, Daniele, Thaís, Elisângela, Nara, Mirelly, Kelly, Gaby, Ana Luisa, Andrés, Aline, André, Thamires, Rose e Carzinho, pelo prazer do trabalho compartilhado, compartilhando forças e aprendizado, dividindo dificuldades e pelo apoio em todos os momentos.

Aos meus colegas de curso, pela amizade, pelos momentos, ensinamentos e conhecimentos compartilhados.

Ao Forró e todos os amigos da dança, pela força e pelo carinho, por me proporcionarem momentos de descontração, alegria e de conhecer tantas pessoas e histórias.

A todos estes e aos que não foram citados e que, de alguma forma, contribuíram para esta conquista.

## RESUMO

A virose conhecida como estria da bananeira, causada por espécies do gênero *Badnavirus*, foi originalmente associada à espécie denominada *Banana streak virus* (BSV). Entretanto, até o momento, já foram reconhecidas outras nove espécies do mesmo gênero, e outras mais capazes de induzir os mesmos sintomas têm sido propostas em diferentes locais do mundo onde essa planta é cultivada. Como, no Brasil, as espécies de *Badnavirus* associadas à bananeira não são bem conhecidas, este estudo foi realizado com o objetivo de coletar e caracterizar isolados virais em lavouras de diferentes regiões produtoras. Foram coletadas amostras em seis estados brasileiros, as quais foram, inicialmente, testadas por PCR, utilizando-se *primers* degenerados. As amostras positivas foram submetidas à técnica de *rolling circle amplification* (RCA) para a confirmação da presença da forma episomal do vírus e, em seguida, nove isolados, que foram RCA positivos, foram novamente submetidos à amplificação de fragmentos genômicos com 540 pb, localizados no gene da RT/RNaseH, para sequenciamento e análise, visando à identificação das espécies. Seguindo o critério de classificação dos *Badnavirus*, os isolados MGYSR e CEPRCA foram classificados como *Banana streak MY virus* (BSMYV), com identidade de nucleotídeos entre 94% e 97%; os isolados RJMACA e RJTQUI, como *Banana streak UC virus* (BSUCV), com identidades entre 93% e 94%; os isolados ESTERRA 1, MGJAPI e PRCAT2, como *Banana streak GF virus* (BSGFV), com identidades entre 87% e 98% e o isolado SPTAM, como *Banana streak Uganda G virus* (BSUGV). O isolado ESTERRA 2 apresentou identidades inferiores a 80% com as espécies de *Badnavirus* disponíveis no GenBank, entretanto, apresentou identidade de 95% com uma espécie encontrada recentemente no Brasil, depositada sob a referência KJ201876, confirmando a presença de uma nova espécie de *Badnavirus* no país. A técnica de RCA permitiu a diagnose de sequências episomais em 31 amostras de sete estados brasileiros. Além de evidenciar a grande variabilidade desse vírus, neste estudo mostra-se a presença de espécies ainda não detectadas anteriormente no país, indicando a necessidade de continuar a explorar essa importante virose em território brasileiro.

Palavras-chave: *Badnavirus*. RCA. *Banana streak virus*. RT/RNaseH.

## ABSTRACT

The virus disease known as banana streak, caused by species of *Badnavirus* genus, was originally associated with the virus species called Banana streak virus (BSV). However, to date, other 9 species of the same genus that are also capable of inducing the same symptoms have been proposed, in different places in the world where this plant is grown. As in Brazil *Badnavirus* species associated with banana streak are not well known, the aim of this study was to collect and characterize viral isolates in banana crops located in different Brazilian regions. Samples were collected in six Brazilian states, and were initially tested by PCR using degenerate primers. The PCR positive samples were subjected to rolling circle amplification method (RCA) to confirm the presence of episomal viruses, and then nine isolates that were RCA positive were again subjected to amplification of genomic 540 bp fragments, located in the gene RT/RNase H for sequencing and analysis, aiming the identification of species. Following the criteria of *Badnaviruses* classification, the isolates named MGYSR and CEPRCA were classified as *Banana streak MY virus* (BSMYV), with nucleotides identity between 94 and 97%, the RJMACA and RJTQUI isolates were classified as *Banana streak UC virus* (BSUCV), with identities between 93 and 94%, the ESTERRA 1, MGJAPI and PRCAT2 isolates as *Banana streak GF virus* (BSGFV), with identities between 87 and 98%, and the SPTAM isolate as *Banana streak UG virus* (BSUGV). The isolate ESTERRA 2 presented identities below 80% with the species of *Badnavirus* available in GenBank, however, showed 95% identity with the species found recently in Brazil and named *Banana streak Brazilian A virus* (BSBAV) whose reference in GenBank is KJ201876, confirming the presence of a new species of *Badnavirus* in this country. The RCA technique allowed the diagnosis of episomal sequences in 31 samples from seven Brazilian states. Besides highlighting the great variability of this virus, this study shows the presence of species that has not been reported previously, indicating the need to further explore those important *Badnaviruses* in Brazil.

Keywords: *Badnavirus*, RCA, *Banana streak virus*, RT/RNaseH.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Organização do genoma do BSV. O ciclo completo representa a dupla fita de DNA. O ciclo interno mostra o mapa dos transcritos com a posição estimada do terminal 3'. Os outros arcos indicam a posição das três ORF (HARPER et al., 1999a) .....	19
Figura 2 Mecanismo de amplificação do DNA circular pela técnica RCA com o uso da polimerase Phi29 (JAMES et al., 2011a) .....	27
Figura 3 Clodograma construído com base na sequência de nucleotídeos da região codificadora RT/RNaseH dos isolados de Badnavirus estudados juntamente com os do GenBank. Os valores foram obtidos pelo programa Mega 6.0 e teste neighbor-joining, com 3.000 repetições.....	41
Figura 4 Cladograma construído com base na sequência de aminoácidos da região codificadora RT/RNaseH dos isolados de Badnavirus estudados juntamente com os do GenBank. Os valores foram obtidos pelo programa Mega 6.0 e teste neighbor-joining, com 3.000 repetições .....	42

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	<i>Primers</i> empregados para a amplificação do genoma do <i>Banana streak virus</i> (BSV) pela técnica de RCA. ....	30
Tabela 2	Isolados disponíveis no GenBank empregados para comparação com os isolados brasileiros .....	32
Tabela 3	Origem e denominação dos isolados brasileiros coletados, resultados dos testes de diagnose por PCR e RCA.....	34
Tabela 4	Porcentagem (%) de identidade entre as sequências de nucleotídeos da região codificadora RT/RNaseH dos isolados do Brasil com GenBank.....	36
Tabela 5	Porcentagem (%) de identidade entre as sequências de aminoácidos da região codificadora RT/RnaseH dos isolados do Brasil com GenBank.....	37

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO .....	11
2	REFERENCIAL TEÓRICO .....	15
2.1	A cultura da bananeira: histórico, classificação e importância econômica .....	15
2.2	O complexo <i>Banana streak Badnavirus</i> .....	17
2.3	Sintomatologia e controle .....	21
2.4	Integração no genoma da planta hospedeira .....	22
2.5	Implicações da variabilidade do BSV e da ocorrência de EPRVs nas técnicas de diagnose .....	25
3	MATERIAL E MÉTODOS .....	28
3.1	Coleta e armazenamento das amostras e realização dos ensaios .....	28
3.2	Extração do ácido nucleico (DNA total) .....	28
3.3	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (PCR) .....	29
3.4	<i>Rolling circle amplification</i> (RCA) .....	30
3.5	Sequenciamento e análise das sequências genômicas .....	31
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	33
7	CONCLUSÃO .....	45
	REFERÊNCIAS .....	46

## 1 INTRODUÇÃO

A banana destaca-se como a fruta mais produzida e consumida no mundo. No Brasil, o clima favorável possibilita a produção e a oferta da fruta o ano todo, tornando o país o quarto maior produtor mundial, com cerca de sete milhões de toneladas e área de cultivo de, aproximadamente, 500 mil hectares (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS - FAO, 2013). As regiões que mais se destacam são a nordeste e a sudeste que, na safra de 2015, somaram mais de 67% da área plantada no Brasil. No entanto, a ocorrência de problemas fitossanitários tem onerado grande parte dos pequenos produtores devido aos custos de manejo e à baixa produtividade das cultivares de bananeira, quando afetadas pelos diferentes patógenos. Quando afetada por doenças viróticas, a planta é condenada ao roging, devido à escassez de variedades resistentes, à ausência de medidas curativas e à dificuldade de se exterminar os vetores virais, tornando o problema ainda mais grave.

As viroses mais comuns encontradas na bananeira são três: o mosaico da bananeira, causado pelo *Cucumber mosaic virus* (CMV); a estria da bananeira, que originalmente era causada pelo *Badnavirus Banana streak virus* (BSV), mas que, atualmente, pode ser induzida por um complexo de espécies derivadas geneticamente do BSV, e o “bunch top”, causado pelo *Banana bunchy top virus* (BBTV). Entretanto, no Brasil, apenas as duas primeiras já foram relatadas (BRIOSO, 2003).

Os principais vetores dos *Badnavirus* associados à estria da bananeira são as cochonilhas *Planococcus citri* e *Saccharicoccus sachari*, porém, outras espécies de cochonilhas também podem atuar na sua transmissão, de forma semipersistente (KUBIRIBA et al., 2001a, 2001b; SILVEIRA et al., 2008). Como a bananeira é propagada vegetativamente, o uso inadvertido de material

infectado para propagação tem se caracterizado como a mais importante via de disseminação do vírus (DANIELLS; THOMAS; SMITH, 1995).

A planta infectada pode manifestar sintomas variáveis, como pequenas lesões amarelas, estrias cloróticas e necróticas nas folhas, riscas estreitas e alongadas na face externa do pseudopécio, lesões irregulares em frutos verdes e escurecimento vascular localizado no engaço (BRIOSO; PEREIRA; GASPAROTTO, 2011). Também são observadas alterações na absorção e na translocação de macronutrientes (PEREIRA; MOREIRA; GASPAROTO, 2003) e no metabolismo dos hormônios de crescimento (SILVEIRA et al., 2007, 2008).

Esses vírus causam perdas consideráveis na bananicultura. Eles têm características genéticas distintas, o que tem tornado difícil sua classificação, detecção e controle. Nove espécies já foram reconhecidas pelo ICTV (*International Committee on Taxonomy of Virus*), sendo *Banana streak MY virus* (BSMYV), *Banana streak OL virus* (BSOLV), *Banana streak GF virus* (BSGFV) e *Banana streak VN virus* (BSVNV), *Banana streak IM virus* (BSIMV), *Banana streak UA virus* (BSUAV), *Banana streak UI virus* (BSUIV), *Banana streak UL virus* (BSULV) e *Banana streak UM virus* (BSUMV). Porém, com o avanço dos estudos, novas espécies estão sendo propostas.

Outra peculiaridade desses *Badnavirus* é a sua capacidade de se integrar no genoma nuclear da planta hospedeira. Sequências integradas parecem ser um fenômeno comum dentro de gêneros da família *Caulimoviridae* e já foram descritas associadas a vários hospedeiros, sendo denominadas de sequências endógenas de pararetrovírus (*Endogenous Pararetroviral Sequences - EPRVs*) (METTE et al., 2002; STAGINNUS et al., 2009). Dois tipos de EPRVs são encontrados associados à bananeira. O primeiro tipo, denominado EPRVs, compreende sequências incompletas do genoma do vírus, sendo incapazes de causar doença (GEERING et al., 2001, 2005a, 2005b; HARPER; HULL, 1998;

LAFLEUR; LOCKHART; OLSZEWSKI, 1996; SU et al., 2007; UDE et al., 2002). O outro tipo corresponde a sequências endógenas ativas (eaBSVs) contendo genoma completo do BSV (D'HONT et al., 2012; GAYRAL et al., 2008; GEERING et al., 2001, 2005b; JAMES et al., 2011a). As eaBSVs podem se tornar patogênicas sob condições específicas de estresse e na ocorrência de eventos nas sequências integradas, levando à reconstituição e à ativação do genoma viral (COTE et al., 2010; DALLOT et al., 2001; NDOWORA et al., 1999).

Dessa forma, além da dificuldade de se diagnosticar esses *Badnavirus* por sorologia, devido à sua variabilidade genética, a sua diagnose por métodos moleculares, como PCR, também se torna difícil, podendo levar a falsos positivos, quando são detectadas as EPRVs.

Diante do exposto, a diagnose precisa do BSV, prática que é imprescindível para a certificação de mudas de bananeira, ainda é limitada. Adicionalmente, devido à diversidade genética desse fitovírus, sua diagnose por métodos sorológicos torna-se impraticável, pelo seu alto potencial de gerar resultados falsos negativos ou falsos positivos. Por outro lado, a ocorrência de eaBSVs também pode gerar resultados imprecisos, mesmo quando se utilizam métodos moleculares. Para superar essas limitações foi proposta a técnica de diagnóstico chamada *Rolling circle amplification* (RCA) (JAMES et al., 2011b), para a detecção e a diferenciação das sequências integradas e episomais do vírus. A técnica faz uso da DNA polimerase do bacteriófago Phi29, que tem sido utilizado para caracterizar moléculas circulares de DNA, inclusive plasmídeos (DEAN et al., 2001; REAGIN et al., 2003) e diversos vírus que infectam humanos, animais e plantas (JOHNE et al., 2009).

No Brasil, a diagnose eficiente do BSV ainda continua sendo um grande desafio para os produtores de mudas certificadas, pois as espécies que aqui ocorrem não estão ainda bem caracterizadas. Nesse contexto, o presente trabalho

foi realizado com o objetivo de coletar amostras de bananeira assintomáticas e com sintomas de estrias, em diferentes regiões do Brasil, e fazer sua diagnose e caracterização molecular, visando identificar as espécies de *Badnavirus* que aqui ocorrem.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 A cultura da bananeira: histórico, classificação e importância econômica

A bananeira, gênero *Musa*, é considerada umas das mais antigas culturas domesticadas. Estudos arqueológicos e linguísticos indicam que a domesticação da banana data de sete mil anos, no sudeste da Ásia, onde ocorre da Índia à Polinésia, o qual é considerado seu centro de origem (SIMMONDS, 1962; SIMMONDS; SHEPHERD, 1955). O seu centro de diversidade atribuído à Malásia ou à Indonésia (DANIELLS et al., 2001; HESLOP-HARRISON; SCHWARZACHER, 2007) e se considera que essa diversidade seja conhecida em todo o mundo (HESLOP-HARRISON; SCHWARZACHER, 2007). No entanto, há indícios de que o início da hibridação entre *M. accuminata* e *M. balbisiana* possa ter ocorrido devido à interferência humana, há 11.700 anos (LI et al., 2013).

A maioria das cultivares atuais pode ter surgido por um processo de seleção tradicional (GEERING et al., 2005a). As variedades comerciais atuais são originárias dos grupos selvagens *Musa accuminata* (genoma A), *Musa balbisiana* (genoma B) e, em menor proporção, *Musa schizocarpa* (genoma S) e *Musa textilis/Musa maclayi* (genoma T) (DANIELLS et al., 2001; D'HONT et al., 2012). Atualmente, a classificação da banana cultivada é feita com base em descritores morfológicos e composição genômica, sendo dividida em genótipos AA, AB, AAA, AAB e ABB (SIMMONDS; SHEPHERD, 1955), embora as variedades cultivadas sejam compostas de genoma diploide, triploide ou tetraploide, os quais constituem os grupos AA, BB, AB, AAA, AAB, ABB, AAAA, AAAB, AABB e ABBB (ALVES, 1999).

Essa hibridização fez com que as atuais bananas cultivadas diferissem de seus progenitores, por não possuírem sementes e serem partenogênicas, ou seja, desenvolvem frutos sem sementes, sem polinização ou fertilização (HESLOP-HARRISON; SCHWARZACHER, 2007), sendo sua propagação realizada apenas por via vegetativa. Apesar disso, observa-se um elevado grau de diversidade morfológica no tamanho, na forma e na cor dos frutos (LI et al., 2013). A hibridização e a seleção permitiram o cultivo de bananeiras e plátanos nas mais importantes regiões tropicais e subtropicais do mundo, onde são cultivadas em uma área de cerca de 10,5 milhões de hectares, com produção de 143,8 milhões de toneladas, em 2013 (FAO, 2013).

No Brasil, o clima favorável possibilita a produção e a oferta da fruta o ano todo, fato que coloca o país como o quarto maior produtor mundial, com cerca de sete milhões de toneladas e área de cultivo de, aproximadamente, 500 mil hectares (FAO, 2013; INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE, 2014), o que corresponde a 4,76% da área cultivada no mundo. Para a safra nacional de banana, em 2015, foi estimada uma área colhida de 479.192 hectares, com produção de 6.992.476 toneladas e rendimento médio de 14,59 toneladas por hectare (IBGE, 2014). O cultivo da bananeira está distribuído por todo o território nacional, com destaque para as regiões nordeste e sudeste, que somam mais de 66% da área plantada no país. A maioria dos bananicultores é composta de pequenos produtores da agricultura familiar que, quase sempre, têm a bananicultura como única fonte de renda, fato que a leva a ser considerada uma das atividades agrícolas de grande importância para o agronegócio brasileiro, funcionando, ainda, como elemento de fixação de populações no campo. A quase totalidade da produção é comercializada no mercado interno.

Apesar disso, a ocorrência de problemas fitossanitários, como o mal-do-panamá (*Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense*), o moko (*Pseudomonas*

*solanacearum*) e o nematoide (*Radopholus similis*), tem onerado grande parte dos pequenos produtores, devido aos custos de manejo e à baixa produtividade de cultivares de bananeira quando atacadas. Esse fato é ainda mais grave quando se trata de agentes causadores de doenças viróticas, como o *Cucumber mosaic virus* e o complexo *Banana streak Badnavirus*, devido à escassez de variedades resistentes, medidas curativas e dificuldade de se exterminar os vetores dos vírus.

## **2.2 O complexo *Banana streak Badnavirus***

A doença conhecida como estria da bananeira (*streak disease of banana*, termo em inglês) é causada por várias espécies de *Badnavirus*, sendo coletivamente conhecidas como *Banana streak virus* (BSV) (SHARMA et al., 2015). O BSV foi observado, pela primeira vez, em bananeiras da cultivar Poyo, na Costa do Marfim, em 1968, por Lassoudiere (1974), porém, foi descrito apenas em 1986, por Lockhart (1986), causando doença em plantas de banana (*Musa* sp.) no Marrocos. Mais tarde, este vírus foi classificado como pertencente à família *Caulimoviridae*, gênero *Badnavirus* e como um integrante do grupo pararretrovírus (HARPER; HULL, 1998), ou seja, durante seu processo de replicação, seu genoma é diretamente transcrito em um RNA mensageiro, que é sintetizado a partir do genoma original e pode ser transcrito novamente em DNA pela transcriptase reversa. Apresenta partículas baciliformes, não envelopadas, com dimensões de 30 nm x 130 a 150 nm, as quais contêm uma molécula circular de DNA de fita dupla (dsDNA) de, aproximadamente, 7,4 a 8,0 Kb, apresentando três *open reading frame*, ou ORF. As duas menores codificam duas proteínas de, aproximadamente, 22 e 14 kDa, respectivamente, cuja função ainda não está elucidada. A ORF maior codifica uma poliproteína de 208 kDa que, após ser clivada, gera proteínas de movimento, capa proteica, aspartil

protease, transcriptase reversa (TR) e RNaseH (HARPER; HULL, 1998) (Figura 1).

O BSV ocorre em todo o mundo (ZHUANG et al., 2011) e tem sido causador de perdas de 6% a 7% ao ano, dependendo do cultivar, da espécie viral e das condições ambientais. Não ocorre disseminação planta-planta, mas a transmissão via mudas pode ser de 100% (DANIELLS et al., 2001). Além disso, cultura de tecidos apresenta risco adicional para a expressão de integrantes episomais e a indução de infecções de BSV, atuando como gatilho para a expressão do vírus da estria da banana em plantas saudáveis, ativando sequências integradas de BSV (DALLOT et al., 2001).

A intensidade de subdivisão aplicada na cultura de tecidos pode modular a frequência de expressão BSV a partir de sequências integradas. O aumento de linhas micropropagadas infectadas ao longo do tempo, bem como a elevada heterogeneidade da infecção entre as plântulas resultantes da mesma linha micropropagada, sugere que a expressão episomática BSV ocorre aleatoriamente e de forma não simultânea nas diferentes células, constituindo a proliferação do vírus (DALLOT et al., 2001). Estes diferentes aspectos da expressão BSV, durante a fase de proliferação, são coerentes com o efeito conhecido da cultura de tecidos em genomas de plantas, o que faz com que o risco de infecção de BSV em bananeiras torne-se um obstáculo ao intercâmbio de germoplasma de *Musa* sp, principalmente micropropagada.

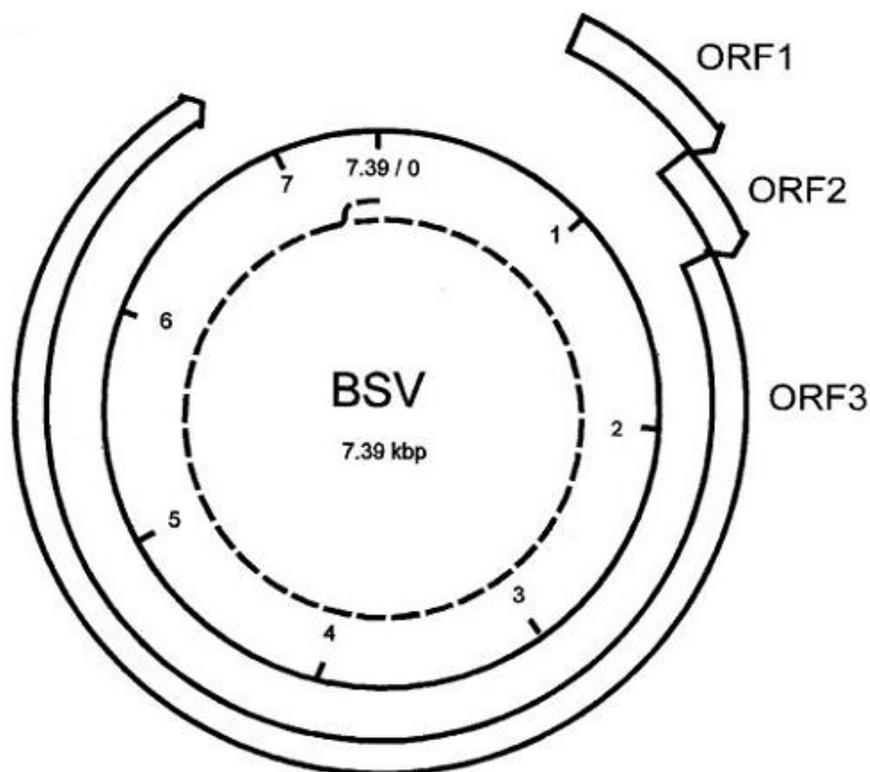


Figura 1 Organização do genoma do BSV. O ciclo completo representa a dupla fita de DNA. O ciclo interno mostra o mapa dos transcritos com a posição estimada do terminal 3'. Os outros arcos indicam a posição das três ORF (HARPER et al., 1999a)

Quanto à taxonomia, o *International Committee on Taxonomy of Virus* (ICTV) estabelece como critério, para o gênero *Badnavirus*, que espécies distintas são aquelas que apresentem mais de 20% de diferença na sequência de nucleotídeos do gene que codifica a RT/RNase H. Para *Badnavirus* essa sequência equivale a cerca de 580 pb (YANG et al., 2003). Com base nesse critério, diversas outras espécies de *Badnavirus* associadas à bananeira têm sido propostas. O ICTV reconheceu oficialmente, até o momento, nove espécies de *Badnavirus*: *Banana streak GF virus* (BSGFV), *Banana streak IM virus*

(BSIMV), *Banana streak MY virus* (BSMYV), *Banana streak OL virus* (BSOLV), *Banana streak UA virus* (BSUAV), *Banana streak UI virus* (BSUIV), *Banana streak UL virus* (BSULV), *Banana streak UM virus* (BSUMV) e *Banana streak VN virus* (BSVNV), que já estão bem caracterizadas (HULL et al., 2005; JAMES et al., 2011a).

No Brasil, o BSV foi relatado, pela primeira vez, por Brioso et al. (2000) e mais tarde diagnosticado em infecções simples ou em associação com *Cucumber mosaic virus*, em amostras coletadas nos estados do Acre, Amazonas, Bahia, Ceará, Goiás, Minas Gerais, Piauí, Rio de Janeiro, Rondônia, Santa Catarina e São Paulo (FIGUEIREDO; BRIOSO, 2007; FIGUEIREDO et al., 2006). Nessa mesma época foi diagnosticado em mudas originadas de cultura de tecido oriundas de Israel e da Costa Rica (COLARICCIO et al., 2006; MARINHO; BATISTA, 2005). Segundo Brioso, Pereira e Gasparotto (2011), a introdução e a disseminação de espécies de *Badnavirus* no Brasil devem-se, principalmente, à ocorrência da sigatoka-negra, causada pelo fungo *Mycosphaerella fijiensis* Morelet, em que se fez necessária a utilização de material propagativo de diversas origens, em virtude da utilização de grandes quantidades de mudas propagadas via cultura de tecidos, em substituição às cultivares suscetíveis ao fungo. No Brasil, foram relatadas duas espécies de *Badnavirus*, *Banana streak OL virus* (BSOLV) (LOMBARDI; HARAKAVA; COLARICCIO, 2010) e *Banana streak UC vírus* (ALVES, 2013), além de espécies candidatas denominadas *Banana streak brazilian A virus* e *Banana streak brazilian B virus* (SILVA et al., 2013), e *Banana streak UB virus* (BSUBV) (BRIOSO et al., 2011; POLTRONIERI et al., 2009), além de outras variantes genéticas denominadas BRSV-BR, BRSV-BR2, BRSV-BR3 e BRSV-BR4, descritas por Figueiredo e Brioso (2007) e Figueiredo et al. (2006).

### 2.3 Sintomatologia e controle

O BSV já foi encontrado infectando plantas dos grupos genéticos de bananeiras AA, AB, AAA, AAB, AABB e AAAB, em vários países, as quais apresentaram alta suscetibilidade. As estirpes de *Badnavirus* em bananeira induzem sintomas iniciando com pequenas lesões amarelas, em forma de pontuações, que se estendem formando estrias cloróticas, paralelas às nervuras secundárias que, ao se necrosarem, tornam-se escuras, distribuídas sobre as folhas, e também riscas estreitas e alongadas na face externa do pseudopecíolo das plantas, podendo afetar todas as folhas da planta (BRIOSO et al., 2011; PEREIRA; MOREIRA; GASPAROTO, 2003). Em frutos verdes ocorrem lesões de formato irregular que podem se intensificar após a maturação, depreciando-os completamente para a comercialização. No engaço, pode ocorrer escurecimento vascular localizado, que se constitui de manchas longas e arredondadas ou estrias internas alongadas em todo o segmento do engaço (BRIOSO et al., 2011). Os danos à planta também estão relacionados às alterações na absorção e na translocação de macronutrientes, resultando em menor taxa de emissão foliar e redução significativa no peso ou, até, ausência dos cachos (PEREIRA; MOREIRA; GASPAROTO, 2003). Além disso, segundo Silveira et al. (2007, 2008), alterações no metabolismo dos hormônios de crescimento causam redução do tamanho de folhas, flores e raízes, e encurtamento dos pecíolos e entrenós. Muitas vezes, esses sintomas podem ser confundidos com aqueles causados pelo *Cucumber mosaic virus* (CMV), podendo estar ausentes (LOCKHARTET; OLSZEWSKI, 1993).

A expressão dos sintomas é mais evidente no período de iniciação do cacho, decrescendo no período de emergência deste, podendo ser influenciado pela temperatura ambiente. Dados experimentais mostraram que a expressão de sintomas foi maior quando as plantas cresceram continuamente a 22 °C,

quando comparadas àquelas que foram mantidas em temperaturas superiores a 28 °C (DAHAL et al., 1998, 2000a). Além da temperatura, a presença e a severidade dos sintomas dependem do número de fatores envolvidos, como o genótipo do hospedeiro e do vírus e a concentração do vírus na planta (DAHAL et al., 1998, 2000b; DANIELLS et al., 2001).

Além dos danos visuais, a infecção por BSV também leva a danos econômicos, pelo atraso no tempo de colheita em até 18 dias, como observado por Daniells et al. (2001), levando a uma redução, por ano, de 6% na primeira colheita. Na colheita da soca há redução de até 7% no peso do cacho e um atraso de 9 dias na colheita, resultando em 11% na redução da banana colhida por ano. Em adição, o comprimento dos frutos também é comprometido.

Atualmente, no Brasil, os critérios e os procedimentos de prevenção e controle do BSV são regulamentados pela Instrução Normativa nº 29, de 29 de fevereiro de 2012, em que é considerado praga não quarentenária regulamentada (BRASIL, 2012). A erradicação de mudas e/ou plantas infectadas é a estratégica forma de controle para as principais viroses da bananeira, que contribuem eficientemente para a redução da sua incidência (BRIOSO; PEREIRA; GASPAROTTO, 2011).

#### **2.4 Integração no genoma da planta hospedeira**

Sequências integradas, denominadas sequências endógenas de pararetrovírus (*Endogenous Pararetroviral Sequences – EPRV*), têm sido consideradas um fenômeno comum e ocorrem esporadicamente dentro de gêneros da família *Caulimoviridae* (GAYRAL et al., 2010; GEERING; SCHARASCHKIN; TEYCHENEY, 2010; PAHALAWATTA; DRUFFEL; PAPPU, 2008; STAGINNUS et al., 2007, 2009; SU et al., 2007). Os pararetrovírus têm a habilidade de se integrar no genoma nuclear da planta

hospedeira e constituem o tipo mais comum de sequências endógenas em plantas (STAGINNUS; RICHERT-PÖGGLER, 2006). Já foram descritos EPRVs na maioria dos gêneros da família *Caulimoviridae* (*Petuvirus*, *Cavemovirus*, *Badnavirus*, *Tungrovirus* e *Caulimovirus*), exceto *Soymovirus* (GAYRAL; ISKRA-CARUANA, 2009). Além de integrar o genoma da bananeira (NDOWORA et al., 1999), essas sequências já foram descritas em espécies de fumo (JAKOWITSCH et al., 1999), *Poncirus trifoliata* (YANG et al., 2003), petúnia (RICHERT-POGGELER et al., 2003), arroz (KUNII et al., 2004), solanáceas (HANSEN; HARPER; HESLOP-HARRISON, 2005), *Dracaena braunii* (bambu-afortunado) (SU et al., 2007), tomateiro (STAGINNUS et al., 2007), dália (PAHALAWATTA; DRUFFEL; PAPPU, 2008), abacaxizeiro (GAMBLEY et al., 2008), videira (BERTSCH et al., 2009), álamo (BERTSCH et al., 2009), figueira (LANEY; HASSAN; TZANETAKIS, 2012) e inhame (SEAL et al., 2014).

Em bananeira têm sido encontrados dois tipos de sequências integradas. O primeiro tipo, denominado EPRVs, compreende sequências incompletas do genoma viral, sendo incapaz de causar doença e pode ser encontrado tanto em bananeiras de genoma do tipo A como B e S (GEERING et al., 2001, 2005a, 2005b; HARPER; HULL, 1998; LAFLEUR; LOCKHART; OLSZEWSKI, 1996; SU et al., 2007; UDE et al., 2002). O outro tipo, corresponde a sequências endógenas ativas (eaBSVs) contendo genoma completo do BSV e tem sido encontrado somente em plantas do genoma tipo A (D'HONT et al., 2012) e B (GAYRAL et al., 2008; GEERING et al., 2001, 2005b; JAMES et al., 2011a).

A maioria dos EPRVs resulta em um genoma parcial e não funcional (GEERING et al., 2005a). Por outro lado, diversas integrações do tipo eaBSVs contêm o genoma completo do vírus com ORFs funcionais, podendo ser ativadas, resultando na liberação de genomas funcionais que infectam a planta hospedeira (GAYRAL et al., 2008, 2010; GAYRAL; ISKRA-CARUANA,

2009; GEERING et al., 2005a; KUNII et al., 2004) e consistem do genoma completo dos BSV epissomais caracterizados.

Sequências eaBSVs podem se tornar patogênicas sob condições específicas de estresse, como o causado pela cultura de tecidos, o déficit hídrico e os processos de hibridação, devido à ocorrência de eventos nas sequências integradas que resultam na reconstituição e na ativação do genoma viral (COTE et al., 2010; DALLOT et al., 2001; NDOWORA et al., 1999). A estrutura de sequências de EPRVs pode ser complexa, sendo que todos já descritos, geralmente, consistem em padrões similares de rearranjos que mostram repetições em *tandem* (múltiplas sequências repetidas de DNA), fragmentações, inversões e duplicações do genoma virótico ou partes deste (CHABANNES; ISKRA-CARUANA, 2013; GAYRAL et al., 2008; JAVER-HIGGINSON et al., 2014; NDOWORA et al., 1999; RICHERT-POGGELER et al., 2003).

Acredita-se que a ativação em bananeira pode ocorrer por modificações epigenéticas que acontecem durante a hibridização do genoma parental, como também condições ambientais (COTE et al., 2010; DALLOT et al., 2001; HARPER et al., 2002; NDOWORA et al., 1999) e que ePRVs possam ser geradas e liberadas, de ciclos de EPRV, por mecanismos que envolvem qualquer recombinação homóloga entre regiões repetidas e/ou por meio de transcrição inversa direta (CHABANNES; ISKRA-CARUANA, 2013; HARPER et al., 2002; ISKRA-CARUANA et al., 2010, 2014b; NDOWORA et al., 1999; RICHERT-POGGELER et al., 2003). Sob outro ponto de vista, acredita-se que EPRVs inativos podem ser importantes para o seu hospedeiro, favorecendo o potencial de resistência a vírus relacionados (HULL; HARPER; LOCKHART, 2002; ISKRA-CARUANA et al., 2010, 2014b; MATZKE, 2004; METTE et al., 2002; NOREEN et al., 2007).

O sequenciamento completo do genoma de espécies e isolados do BSV tem sido realizado, fornecendo informações de que existe alto grau de

variabilidade molecular dentro desse complexo (GEERING et al., 2000; HARPER et al., 2004, 2005; JAUFEEERALLY-FAKIM; KHORUGDHARRY; HARPER, 2006). Nesse sentido, uma análise conjunta das sequências episomais, realizada por Iskra-Caruana et al. (2014a), demonstrou que essas sequências formam clados filogeneticamente distintos, mostrando a variabilidade do BSV. Além disso, estudos de imunologia revelam, também, que são sorologicamente muito diversos (GEERING et al., 2000, 2005a, 2005b; HARPER; HULL, 1998; LE PROVOSTET et al., 2007; LOCKHART; OLSZEWSKI, 1993).

O BSV não era considerado um problema sério para a agricultura até a descoberta de integrações endógenas (eaBSV) no genoma nuclear de *Musa balbisiana* (GAYRAL et al., 2008; GAYRAL; ISKRA-CARUANA, 2009; HARPER et al., 1999a; NDOWORA et al., 1999) e, mais recentemente, em *M. acuminata* (D'HONT et al., 2012).

## **2.5 Implicações da variabilidade do BSV e da ocorrência de EPRVs nas técnicas de diagnose**

A diagnose dos vírus que infectam a bananeira é uma tarefa nada fácil. Existe um grande trânsito de mudas de bananeira, não apenas dentro do país, com sua enorme extensão territorial, mas também de fora para dentro do país, aumentando significativamente o risco de disseminação viral. Em adição, o método de propagação vegetativa da bananeira, que consiste na formação de mudas a partir da planta mãe, principalmente em laboratórios de cultura de tecidos em que inúmeras mudas são provenientes de uma única planta matriz, demanda o uso de métodos seguros e eficientes para a sua indexação, visando à detecção dos principais vírus que podem infectá-la.

Os métodos sorológicos se tornam cada vez mais ineficazes devido à grande diversidade genética desses vírus, e o surgimento frequente de novas espécies para as quais não existe a disponibilidade de antissoros (GEERING et al., 2000, 2005a, 2005b; HARPER; HULL, 1998; LE PROVOSTET et al., 2007). Por outro lado, devido à sua capacidade de se integrar ao genoma nuclear da planta hospedeira (GEERING et al., 2001, 2005a, 2005b; HARPER et al., 1999b; HARPER; HULL, 1998; NDOWORA et al., 1999; UDE et al., 2002), a detecção dos *Badnavirus* por métodos moleculares, como o PCR, é bastante complicada. Considerando-se que todas as plantas de bananeiras podem ser portadoras de EPRVs, muitos diagnósticos falsos positivos poderiam ocorrer, levando ao descarte indevido de plantas sadias (HARPER et al., 1999a; ISKRA-CARUANA et al., 2008; JAMES et al., 2011a; LE PROVOST et al., 2006). Em alternativa, foi desenvolvida a técnica IC-PCR que, por capturar o vírus específico por meio de antissoros, antes de realizar a PCR, evitaria a detecção dos EPRVs (HARPER et al., 1999a).

Para contornar essas limitações, uma nova técnica, denominada *Rolling Circle Amplification* (RCA), foi proposta por James et al. (2011a) (Figura 2). A RCA amplifica DNA circular, possibilitando discriminar entre as sequências do DNA do BSV integrado (EPRVs) e episomal (eaBSVs). A técnica faz uso da DNA polimerase do bacteriófago Phi29, que tem sido utilizado para caracterizar moléculas circulares de DNA, inclusive plasmídeos (DEAN et al., 2001; REAGIN et al., 2003) e diversos vírus que infectam humanos, animais e plantas (JOHNE et al., 2009). A descrição, o desenvolvimento e o uso da técnica RCA para a detecção do BSV foram realizados por James et al. (2011a), demonstrado que o método é capaz de diferenciar as sequências integradas e episomais do vírus.

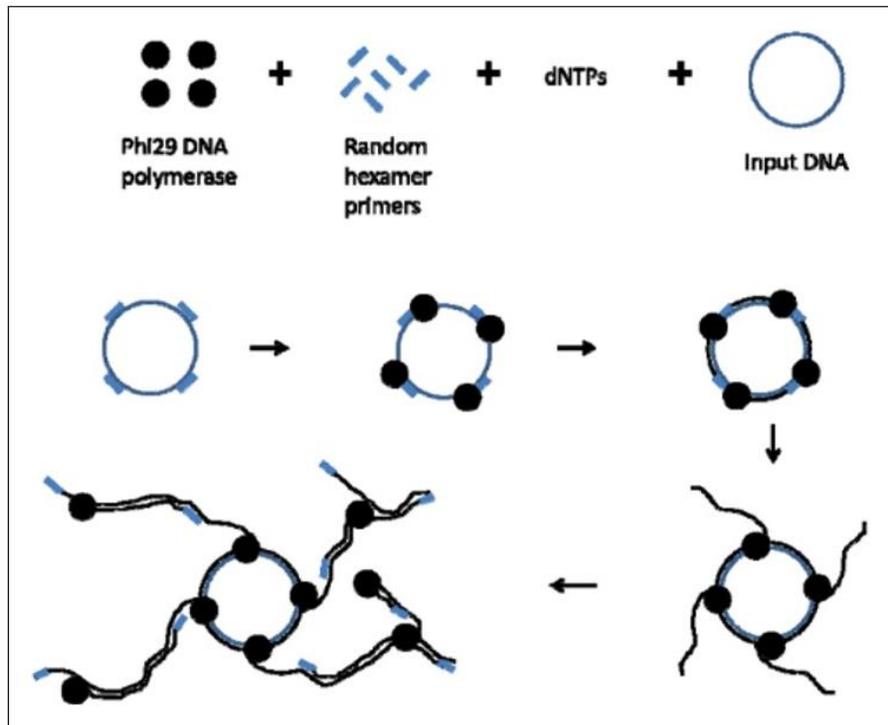


Figura 2 Mecanismo de amplificação do DNA circular pela técnica RCA com o uso da polimerase Phi29 (JAMES et al., 2011a)

### **3 MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 Coleta e armazenamento das amostras e realização dos ensaios**

Os isolados de BSV utilizados neste trabalho foram coletados de regiões distintas do país, nos estados da Bahia, Ceará, Espírito Santo, Minas Gerais, São Paulo, Rio de Janeiro e Paraná, com o auxílio de produtores e pesquisadores comprometidos com a produção de banana. No momento do recebimento das amostras, parte do tecido foi submetida à extração de DNA total e o restante foi acondicionado em freezer, a -80 °C. Os ensaios foram realizados no Laboratório de Virologia Molecular, localizado no Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Lavras.

#### **3.2 Extração do ácido nucleico (DNA total)**

O DNA total das plantas foi extraído a partir do tecido foliar, segundo o protocolo de Lodhi et al. (1994). Para a extração foram macerados 0,15 g de tecido vegetal fresco na presença de nitrogênio líquido e, em seguida, foram adicionados 1,5 ml de tampão CTAB 2% (100 mM Tris-HCL, pH 8,0; 20 mM EDTA; 1,4 M NaCl; 80 mM Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>; 2% PVP-10 e 2% de brometo de cetil trimetil-amônio CTAB), contendo 0,2% de β mercaptoetanol. A mistura foi incubada em banho-maria, por 30 minutos e, a cada 10 minutos, os tubos foram misturados por inversão. Logo depois, foi adicionado igual volume do extrato à solução 24:1 clorofórmio, álcool isoamílico. Os microtubos foram centrifugados, a 12.000 rpm, por 10 minutos, a 4 °C. O sobrenadante foi transferido para novos microtubos e a precipitação do DNA realizada, com a adição de 0,6 vezes o volume de isopropanol frio (-20 °C). A solução foi gentilmente homogeneizada por inversão e incubada, a -20 °C, por 1 hora. Após a precipitação, foi realizada

uma centrifugação de 12.000 rpm, por 10 minutos, a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* lavado com 500 µl de álcool 70% e seco em temperatura ambiente. Em seguida, o *pellet* seco foi ressuspensionado em 30 µl de tampão TE (Tris HCL 1M pH 8,0, EDTA 0,5 M pH 8,0) e a qualidade do DNA extraído foi avaliada por eletroforese em gel de agarose 0,7%, contrastado com Gel Red (Biotium Corp.).

### **3.3 Polymerase Chain Reaction (PCR)**

Inicialmente, o DNA proveniente das plantas com suspeita de infecção foi amplificado por PCR, utilizando-se os diversos *primers* Badna FP e Badna RP (YANG et al., 2003), que amplificam um fragmento de 540 pares de base, que codifica para a RT/RNaseH.

O mix da PCR (25 µl) foi composto por 5 µl de buffer 5X GoTaq Green Master Mix; 0,75 µl de cada *primer*; 1 MgCl<sub>2</sub>; 0,5 µl de dNTP; 16,375 µl de água; 0,125 de enzima e 1 µl de DNA. O ciclo da PCR partiu de uma desnaturação de 95 °C, durante 2 minutos, seguida por 35 ciclos de 95 °C, durante 45 segundos, 50 °C por 1 minuto e 72 °C durante 1 minuto, com extensão final de 72 °C, durante 5 minutos. O produto da PCR foi analisado por eletroforese em gel de agarose a 0,7%.

As amostras positivas foram testadas por RCA e aquelas que também foram positivas tiveram o produto da reação submetido à reação de PCR, conforme descrito previamente. Os fragmentos foram purificados utilizando-se o kit de purificação Illustra™ GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare), seguindo as instruções do fabricante, e enviados para sequenciamento.

### 3.4 Rolling circle amplification (RCA)

A amplificação pela reação de RCA foi realizada utilizando-se o kit Illustra TempliPhi (GE Healthcare, Buckinghamshire, United Kingdom), seguindo-se as recomendações do manual do fabricante. O ácido nucleico (1 µl) foi adicionado a 5 µl de solução tampão e 1 µl de cada *primer* listado na Tabela 1, na concentração de 60 µM. O DNA foi desnaturado a 95 °C, por 3 minutos e, logo depois, foi adicionado à solução de reação do kit (5 µl) preparado previamente com a DNA polimerase (0,2 µl). A reação foi incubada, a 30 °C, por 18 horas, em estufa e, posteriormente, finalizada com incubação, a 65 °C, por 10 minutos. O produto obtido foi analisado em gel de agarose 0,7%.

Tabela 1 *Primers* empregados para a amplificação do genoma do *Banana streak virus* (BSV) pela técnica de RCA.

<b>Primer</b>	<b>Sequência</b>	<b>Referência</b>
1A	CTNTAYGARTGGYTNGTNATGCCNTTYGG	Harper et al. (2002)
4'	TCCAYTTRCANAYNSCNCCCCANCC	Harper et al. (2002)
BadnaFP	ATGCCITTYGGIAARAAYGCICC	Yang et al. (2003)
BadnaRP	CCAYTTRCAIACISICCCCAICC	Yang et al. (2003)
BSV2292	ATGARYTAHATWAGRTGYTMSCC	James et al. (2011a)
BSV2826	TYYWGAAARCATGGTGGGRGARGA	James et al. (2011a)
BSV3298	YTCCCAYCTTTCRAAKACYTT	James et al. (2011a)
BSV3517	KRATMTTYTWYTDGAARATCC	James et al. (2011a)
BSV3700	KTGGBAGTTTKGTRAAGARYTC	James et al. (2011a)
BSV6652	GAAAARRTMTGYGCNTAYGCVAG	James et al. (2011a)
BSV4030	TGCARRTGYTWYGCYTYGGAGA	James et al. (2011a)

### 3.5 Sequenciamento e análise das sequências genômicas

Os fragmentos foram sequenciados pela empresa Myleus Biotecnologia. As análises foram realizadas utilizando-se o programa NCBI BLAST (NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION - NCBI, 2015) e o alinhamento das sequências de nucleotídeos e aminoácidos e a construção de árvores filogenéticas foi feito empregando-se os programas CLUSTAL W2 (V. 2.0) e *Molecular Evolutionary Genetics Analysis* (MEGA 6), respectivamente. A caracterização das espécies seguiu os critérios do ICTV, que consideram espécies distintas de *Badnavirus* sp. aquelas que têm diferenças de identidade acima de 20% na região codificadora RT/RNaseH.

Os isolados do GenBank empregados para comparação estão relacionados na Tabela 2, tendo as relações filogenéticas sido estudadas utilizando-se o algoritmo *neighbor-joining* para aminoácidos e UPGMA para nucleotídeos, empregando-se o *bootstrap* com 3.000 repetições.

Tabela 2 Isolados disponíveis no GenBank empregados para comparação com os isolados brasileiros

Nº. Acesso	Origem	Espécie	Referência
NC_008018	Vietnã	<i>Banana streak acuminata Yunnan virus</i> (BSACYV)	Zhuang et al. (2011)
AJ968435	Uganda	<i>Banana streak GF virus</i> (BSGFV)	Harper et al. (2005)
JF911406	Quênia	<i>Banana streak GF virus</i> (BSGFV)	Não publicado
NC_007002	Equador	<i>Banana streak GF virus</i> (BSGFV)	Não publicado
AB252636	Indonésia	<i>Banana streak MY virus</i> (BSMYV)	Furuya e Natsuaki (2012)
AY805074	Austrália	<i>Banana streak MY virus</i> (BSMYV)	Geering et al. (2010)
KJ013509	Coleção CIRAD (França)	<i>Banana streak MY virus</i> (BSMYV)	Rajeswaran et al. (2014)
AJ002234	Nigéria	<i>Banana streak OL viirus</i> (BSOLV)	Harper e Hull (1988)
HQ593107	Uganda	<i>Banana streak UA virus</i> (BSUAV)	James et al. (2011a)
AJ968464	Uganda	<i>Banana streak UC virus</i> (BSUCV)	Harper et al. (2005)
KJ201882	Uganda	<i>Banana streak UC virus</i> (BSUCV)	Não publicado
KT339379	China	<i>Banana streak UC virus</i> (BSUCV)	Não publicado
AJ968471	Uganda	<i>Banana streak UG virus</i> (BSUGV)	Harper et al. (2005)
KJ201878	Brasil	<i>Banana streak UG virus</i> (BSUGV)	Não publicado
AY189412	Nigéria	Sequência endógena	Harper et al. (2005)
KJ201876	Brasil	<i>Banana streak brazilian A virus</i>	Não publicado
AY452265	Austrália	Sequência endógena	Geering et al. (2005a)
AY189414	Austrália	Sequência endógena	Geering et al. (2005a)
HQ593108	Uganda	<i>Banana streak UI virus</i> (BSUIV)	James et al. (2011a)
NC_015504	Uganda	<i>Banana streak UL virus</i> (BSULV)	James et al. (2011a)

#### 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram coletadas 39 amostras de bananeiras, sintomáticas e assintomáticas, oriundas de sete estados brasileiros (Tabela 3). Trinta e uma amostras de seis estados brasileiros foram diagnosticadas positivas quanto à infecção episomal (eaBSVs) por BSV, utilizando-se a técnica de *Rolling circle amplification* (JAMES et al., 2011a). A técnica RCA tem sido empregada e é a mais recomendada para a indexação rotineira dos tecidos de bananeiras para detecção da presença de *Badnavirus*, pela sua capacidade de detectar apenas vírus ativos (sequências episomais) na planta (JAMES et al., 2011a; WAMBULWA et al., 2012). As demais amostras, positivas somente por PCR convencional, indicam que as sequências detectadas foram do tipo EPRVs, ou seja, sequências incompletas integradas ao genoma da planta. Essas plantas, caso fossem indexadas apenas por PCR, seriam diagnosticadas como positivas e poderiam ser descartadas erroneamente. Este dado corrobora a eficiência da técnica RCA para a diagnose de BSVs ativos e não de sequências endógenas incompletas de *Badnavirus*.

Os isolados que foram sequenciados e analisados foram CEPRCA, do Ceará; ESTERRA 1 e ESTERRA 2, do Espírito Santo; MGJAPI e MGMYS, de Minas Gerais; PRCAT2, do Paraná; RJMACA e RJTQUI, do Rio de Janeiro e SPTAM, de São Paulo. Quando comparados entre si, os isolados estudados apresentaram identidades de nucleotídeos entre 61% e 98%, e de aminoácidos entre 32% e 92%, mostrando que, como ocorre em outros locais do mundo onde se cultiva a banana, existe uma grande variabilidade genômica nos isolados de *Badnavirus* que causam estrias na bananeira (Tabelas 4 e 5). Os isolados que apresentaram identidades acima de 80% entre si foram CEPRCA e MGMYS (92%), ESTERRA e MGJAPI (98%), ESTERRA e PRCAT2 (92%) e também RJMACA e RJTQUI (92%), indicando pertencerem à mesma espécie, segundo o critério taxonômico oficial para os *Badnavirus*.

Tabela 3 Origem e denominação dos isolados brasileiros coletados, resultados dos testes de diagnose por PCR e RCA

Nº da amostra	Genótipo	Cultivar	Origem	Resultado Diagnose		Denominação do isolado <sup>3</sup>
				PCR <sup>1</sup>	RCA <sup>2</sup>	
1	AAB	Tap maeo	Bahia	+	+	BATAPM
2	AAAB	Prata	Ceará	+	+	CEPRCA *
3	AAB	Terra	Espírito Santo	+	+	ESTERRA1 *
4	AAB	Terra	Espírito Santo	+	+	ESTERRA2 *
5	AAAB	Prata	Espírito Santo	+	+	ESPRAT1
6	AAAB	Prata	Espírito Santo	+	+	ESPRAT2
7	-	-	Espírito Santo	+	+	ESLARA
8	AAB	Prata anã	Minas Gerais	+	+	MGPANA1
9	AAAB	Japira	Minas Gerais	+	+	MGJAPI *
10	ABB	Marmelo	Minas Gerais	+	+	MGMAR
11	Não definido	Caju	Minas Gerais	+	+	MGCAJU
12	AAA	Nanica	Minas Gerais	+	+	MGNANI
13	AA	Ouro de Colatina	Minas Gerais	+	+	MGOUCOL
14	AA	Ouro	Minas Gerais	+	+	MGOURO
15	AAAB	Vitória	Minas Gerais	+	+	MGVITO
16	Não definido	Semente	Minas Gerais	+	+	MGSEM
17	AAA	Caru roxa	Minas Gerais	-	-	MGCARU
18	AAB	Maçã roxa	Minas Gerais	+	+	MGMACA1
19	AAB	Terrinha	Minas Gerais	+	+	MGTERRA
20	AABB	Maçã	Minas Gerais	+	+	MGMACA2
21	AAA	Nanicão	Minas Gerais	+	-	sd

Tabela 3, conclusão

Nº da amostra	Genótipo	Cultivar	Origem	Resultado Diagnose		Denominação do isolado <sup>3</sup>
				PCR <sup>1</sup>	RCA <sup>2</sup>	
22	AAAB	Prata	Minas Gerais	+	-	sd
23	AAAB	Pacovã	Minas Gerais	-	-	sd
24	AAAB	SH-3640	Minas Gerais	+	-	sd
25	AAA	Caru verde	Minas Gerais	+	+	MGCARO
26	AA	Ouro mata	Minas Gerais	+	+	MGOUMA
27	AAB	Mysore	Minas Gerais	+	+	MGMYSRS *
28	AAA	Caipira	Minas Gerais	+	+	MGCAIP
29	Não definido	Musa ornata	Minas Gerais	-	-	Sd
30	AAAB	Prata	Minas Gerais	+	+	MGPRATA
31	AAB	Prata anã	Minas Gerais	+	+	MGPANA2
32	AAA	Caturra	Paraná	+	+	PRCAT2 *
33	AAAB	Maçã	Rio de Janeiro	+	+	RJMACA *
34	BB	Três quinas	Rio de Janeiro	+	+	RJTQUI *
35	AAAB	BRS princesa	Rio de Janeiro	-	-	Sd
36	AAAB	Prata	Rio de Janeiro	+	-	Sd
37	AAB	Prata anã	Rio de Janeiro	+	+	RJPANA
38	AAB	Prata mel	Rio de Janeiro	+	+	RJPMEL
39	AAB	Tap maeo	São Paulo	+	+	SPTAM *

<sup>1,2</sup> +: amostras positivas; -: amostras negativas

<sup>3</sup>sd: sem denominação

\*Isolados que foram sequenciados e analisados

Tabela 4 Porcentagem (%) de identidade entre as seqüências de nucleotídeos da região codificadora RT/RNaseH dos isolados do Brasil com GenBank

Nº	Isolados	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		
1	CEPRCA	-	64	70	64	92	66	66	61	65	68	64	64	65	94	95	94	68	25	64	65	64	65	66	61	68	68	65	65	63		
2	ESTERRA1	-	-	64	98	63	92	64	63	64	67	91	98	98	65	65	64	65	24	63	65	62	65	65	64	64	63	62	62	63		
3	ESTERRA2	-	-	-	64	66	70	68	63	66	68	64	63	65	67	67	72	27	65	66	65	66	67	64	95	65	64	64	63	63		
4	MGJAPI	-	-	-	-	63	92	63	62	64	67	91	97	98	64	64	63	65	24	62	64	62	65	65	64	64	62	62	62	63		
5	MGMYS	-	-	-	-	-	63	64	61	62	66	62	63	63	96	97	96	66	24	62	63	63	64	63	62	65	67	63	63	62		
6	PRCCAT2	-	-	-	-	-	-	65	63	67	67	87	92	92	64	65	65	66	24	62	63	62	67	67	66	68	63	64	64	63		
7	RJMACA	-	-	-	-	-	-	-	92	72	67	66	63	64	65	65	65	65	25	93	94	93	72	73	72	67	70	64	64	64		
8	RJTQUI	-	-	-	-	-	-	-	-	68	65	65	63	63	63	63	63	63	24	94	93	93	71	69	71	65	67	56	56	57		
9	SPTAM	-	-	-	-	-	-	-	-	-	67	64	64	64	63	64	64	67	22	70	70	70	84	97	83	65	67	62	62	64		
10	NC008018	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	68	67	67	67	67	67	70	25	66	66	66	68	68	68	67	65	63	63	64		
11	AJ968435	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	91	92	63	63	62	66	24	64	65	63	65	65	64	64	65	63	63	63		
12	JP911406	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	98	65	64	64	65	24	61	64	62	65	65	64	63	63	63	63		
13	NC007002	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	64	65	64	65	24	63	65	62	66	65	65	65	63	62	64		
14	AB252636	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	99	98	69	25	64	65	64	65	64	64	66	69	65	64		
15	AY805074	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	99	68	25	64	65	64	65	65	64	66	69	65	64		
26	KJ013509	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	68	24	64	64	64	65	65	65	66	69	65	65		
17	AJ002234	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	26	64	64	64	68	68	65	72	69	67	64		
18	HQ593107	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	24	24	24	24	24	24	25	24	24	25		
19	AJ968464	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	24	24	24	24	24	24	24	24	25		
20	KJ201882	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	96	99	72	71	71	65	68	63	62	
21	KT339379	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	96	72	71	71	65	68	63	63	
22	AJ968471	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	72	71	71	65	67	62	62	
23	KJ201878	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	85	96	65	69	63	63	
24	AY189412	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	85	66	68	62	65	
25	KJ201876	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	64	68	63	62	
26	AY452265	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	64	63	62	
27	AY189414	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	64	63	
28	HQ593108	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	63	68
29	NC015504	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	78

Tabela 5 Porcentagem (%) de identidade entre as seqüências de aminoácidos da região codificadora RT/RNaseH dos isolados do Brasil com GenBank

Nº	Isolados	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
1	CEPRCA	-	71	60	61	85	62	63	61	34	70	60	61	61	91	91	90	71	27	61	62	61	61	43	61	68	68	57	57	58
2	ESTERRA1	-	-	69	97	58	92	64	60	32	68	95	98	98	64	64	63	71	26	62	63	62	62	34	61	67	60	61	61	60
3	ESTERRA2	-	-	-	68	67	72	66	62	41	73	68	70	70	72	72	71	80	30	63	65	63	65	43	65	95	64	63	63	62
4	MGJAPI	-	-	-	-	58	92	63	60	32	67	95	98	98	63	63	63	70	26	61	63	61	62	34	61	67	60	60	60	60
5	MGMYS	-	-	-	-	-	60	63	57	33	70	58	59	59	92	92	91	69	26	60	62	60	59	36	58	65	69	57	57	58
6	PRCCAT2	-	-	-	-	-	-	65	60	33	68	90	93	93	65	65	65	71	26	62	63	62	63	35	61	69	60	60	60	59
7	RJMACA	-	-	-	-	-	-	-	87	42	68	63	64	64	66	66	66	67	24	91	92	91	77	44	76	65	66	60	60	61
8	RJTQUI	-	-	-	-	-	-	-	-	40	63	59	60	60	62	62	61	63	23	87	89	87	73	42	73	61	62	56	56	56
9	SPTAM	-	-	-	-	-	-	-	-	-	39	32	33	33	34	35	34	38	23	41	40	41	48	94	48	38	36	35	35	39
10	NC008018	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	67	68	68	74	75	74	76	26	67	68	67	67	41	66	71	69	61	61	62
11	AJ968435	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	96	96	64	64	63	71	25	61	62	61	63	34	61	66	61	60	60	60
12	JF911406	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	99	64	65	64	71	26	62	63	62	63	35	61	68	61	61	61	60
13	NC007002	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	64	65	64	71	26	62	63	62	63	35	61	68	61	61	61	61
14	AB252636	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	100	99	75	26	64	65	64	64	36	63	69	72	62	62	63
15	AY805074	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	98	75	27	65	66	65	64	37	63	70	72	62	62	63
26	KJ013509	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	75	26	64	65	64	63	36	62	69	72	61	61	63
17	AJ002234	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	31	65	66	65	66	40	64	77	68	62	62	61
18	HQ593107	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	22	23	22	26	26	25	27	23	25	25	25
19	AJ968464	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	93	99	75	43	73	62	64	57	57	58
20	KJ201882	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	93	77	42	76	64	66	59	59	60
21	KT339379	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	75	43	73	62	64	57	57	58
22	AJ968471	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	51	95	64	68	58	58	59
23	KJ201878	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	50	40	39	36	36	37
24	AY189412	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	63	68	56	56	58
25	KJ201876	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	62	62	62	60
26	AY452265	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	60	60	63
27	AY189414	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	100	83
28	HQ593108	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	83
29	NC015504	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Quando os isolados estudados foram comparados com os isolados de *Badnavirus* do GenBank, que foram empregados para comparação, as identidades de nucleotídeos variaram entre 22% e 98% e as identidades de aminoácidos entre 23% e 98% (Tabela 4). Os isolados CEPRCA e MGMYS mostraram identidades entre 94% e 97% com o isolado AB252636 da Indonésia, o AY805074 da Austrália e o KJ013509 da Coleção CIRAD (França), os quais pertencem à espécie *Banana streak MY virus* (BGMV), sendo, portanto, classificados como membros dessa espécie. Os isolados ESTERRA1, MGJAPI e PRCAT2 foram classificados como *Banana streak GF virus* (BSGFV), por apresentarem identidades entre 87% a 98% de identidades com os isolados AJ968435 de Uganda, JF911406 do Quênia e NC\_007002 do Equador. Os isolados RJMACA e RJTQUI apresentaram identidades entre 93% e 94% com os isolados AJ968464 e KJ201882 de Uganda e KT339379 da China, tendo sido classificados como *Banana streak UC virus* (BSUGV). O isolado SPTAM apresentou identidade de 84% e 97% com os ESTERRA2 e não foram classificados como nenhuma das espécies já reconhecidas pelo ICTV. O isolado ESTERRA2 apresentou similaridade significativa apenas com o acesso KJ201876, do Brasil, sugerido do *Banana streak brazilian A virus*. O isolado SPTAM apresentou identidade igual a 84% com o isolado AJ968471 de Uganda e de 97% com o isolado KJ201878 do Brasil, e foi classificado como *Banana streak UG virus* (BSUGV). Mostrou, ainda, uma identidade de AY189412 com uma sequência endógena detectada em bananeira, na Nigéria, indicando que essa espécie de *Badnavirus* já foi detectada integrada no genoma da bananeira (HARPER et al., 2005).

O isolado ESTERRA2, quando comparado com as espécies já reconhecidas e disponíveis no GenBank, mostrou uma identidade de nucleotídeos que variou entre 27% e 72% e de aminoácidos entre 30% e 80%. A maior identidade foi com a espécie BSOLV, entretanto, não atinge o critério

mínimo necessário para ser considerado um membro dessa espécie, pois o critério empregado é de que haja uma identidade mínima de nucleotídeos de 80%, e não de aminoácidos. Isolado semelhante, o KJ201876, com o qual o ESTERRA2 apresentou identidade de 95%, já foi encontrado anteriormente no estado do Paraná, mostrando que se trata de uma espécie já estabelecida no Brasil, cujo nome proposto foi de *Banana streak brazilian A virus* (BSBAV).

Estudos de diversidade e variabilidade dentro do complexo *Banana strak virus* têm sido realizados, ao longo do tempo, em diversas regiões do mundo. Geering et al. (2000) verificaram baixas identidades entre isolados de BSV na Austrália, com variação de 66,4% a 78,2%, valores equivalente à distância entre outras espécies de *Badnavirus* reconhecidas como *Commelina yellow mottle virus*. Essa diversidade foi mostrada por Harper et al. (2004) que verificaram grande número de espécies de BSV infectando banana em Uganda. Essa variabilidade foi atribuída às várias fontes de introdução da bananeira com diferentes variações gênicas do vírus naquele país. Geering et al. (2005a) encontraram 36 sequências com baixa identidade com as espécies já descritas, sendo consideradas pelos autores como sequências endógenas de *Badnavirus*. Essa variabilidade também foi verificada no Quênia, utilizando-se as técnicas de ELISA, IC-PCR e também com o sequenciamento do genoma (KARANJA et al., 2008). Em Cuba, Javer et al. (2009) identificaram as espécies BSMYV, BSIMV e BSGFV com identidades acima de 96% com isolados do GenBank. Anos mais tarde, Javer-Higginson et al. (2014) encontraram grande diversidade do BSV naquele país, ressaltando a prevalência das espécies BSOLV, BSGFV e BSMYV, com maior incidência de BSMYV. Já James et al. (2011b) detectaram seis novas espécies de BSV (BSUAV, BSUIV, BSULV, BSUMV, BSUIV, BSIM e BSCAV) no leste da África. Assim, essa ampla variabilidade entre os isolados brasileiros e entre os isolados do banco de dados é corroborada pela que ocorre em outras regiões do mundo.

Quanto às divergências nas sequências de aminoácidos observadas, principalmente, no isolado SPTAM, elas indicam que as mutações ocorridas nos nucleotídeos dos *Badnavirus* são, geralmente, do tipo sinônima (NEI; GOJOBORI, 1986). Com relação a isso, Sharma et al. (2015) analisaram taxa de substituição de nucleotídeos de  $7,13 \times 10^{-3}$  a  $1,59 \times 10^{-2}$  e  $2,65 \times 10^{-3}$  a  $5,49 \times 10^{-3}$  em isolados de subpopulações de BSMYV e BSOLV, respectivamente.

No Brasil, quatro isolados virais foram relatados, por Figueiredo et al. (2006), como candidatos a novas espécies: os isolados BSVBR-1, em amostras provenientes dos estados do Acre, Amazonas, Bahia, Ceará, Goiás, Minas Gerais, Piauí, Rio de Janeiro, Rondônia, Santa Catarina e São Paulo; a estirpe BSVBR-2, em amostras oriundas do Amazonas e do Ceará e as estirpes BSVBR-3 e BSVBR-4, apenas do Ceará. Posteriormente, essas estirpes foram classificadas como BSUGV, *Banana streak Brazil 1 virus* (BSBr1V), *Banana streak Brazil 2 virus* (BSBr2V) e *Banana streak Brazil 3 virus* (BSBr3V), respectivamente (POLTRONIERI et al., 2009). Entretanto, essa classificação não foi baseada no sequenciamento genômico do vírus. Os autores inferiram que a ocorrência restrita das estirpes do Amazonas e do Ceará deve-se à introdução de cultivares de bananeiras de outras localidades. Mas, acredita-se que isso possa ser também devido à ativação de sequências endógenas do vírus em razão do estresse ambiental ou por cultura de tecidos (COTE et al., 2010; DALLOT et al., 2001; NDOWORA et al., 1999). BSUBV também foi detectada por Poltronieri et al. (2009), no estado do Pará.

Os cladogramas construídos com base na sequência de nucleotídeos e de aminoácidos, representados nas Figuras 3 e 4, mostram claramente a tendência de agrupamento de isolados da mesma espécie.

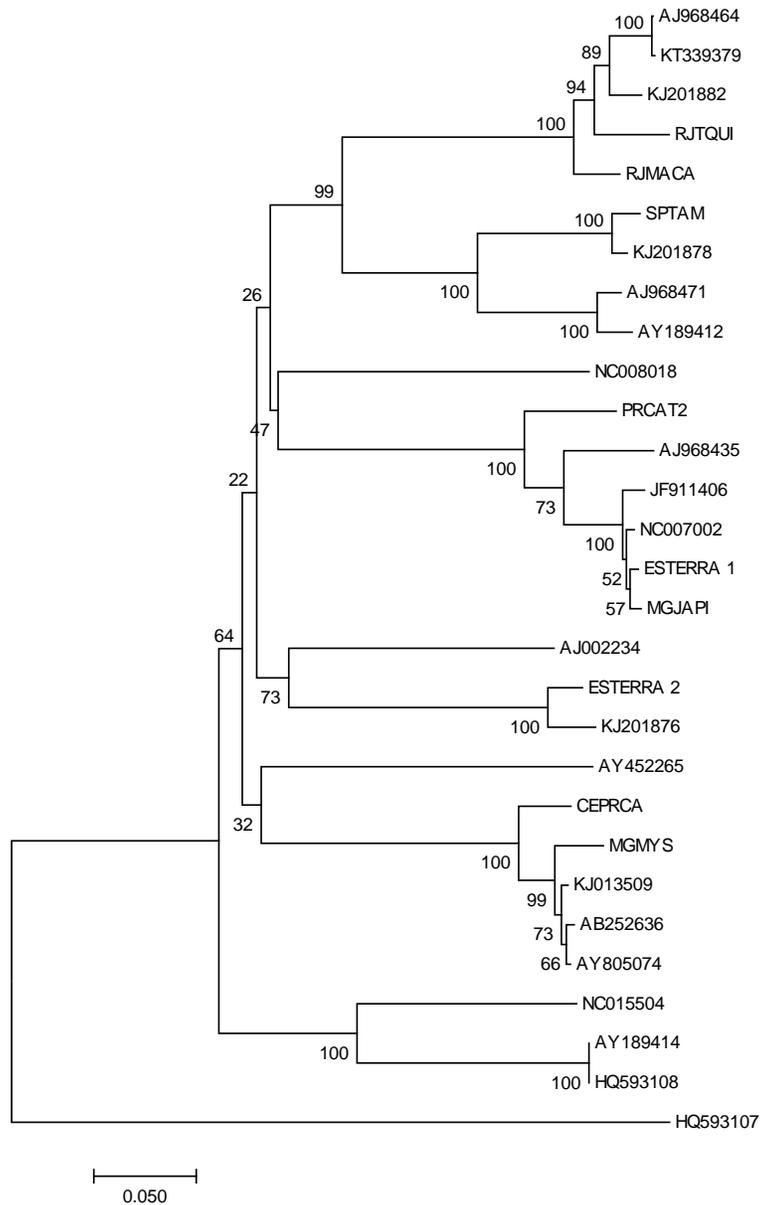


Figura 3 Clodograma construído com base na sequência de nucleotídeos da região codificadora RT/RNaseH dos isolados de Badnavirus estudados juntamente com os do GenBank. Os valores foram obtidos pelo programa Mega 6.0 e teste neighbor-joining, com 3.000 repetições

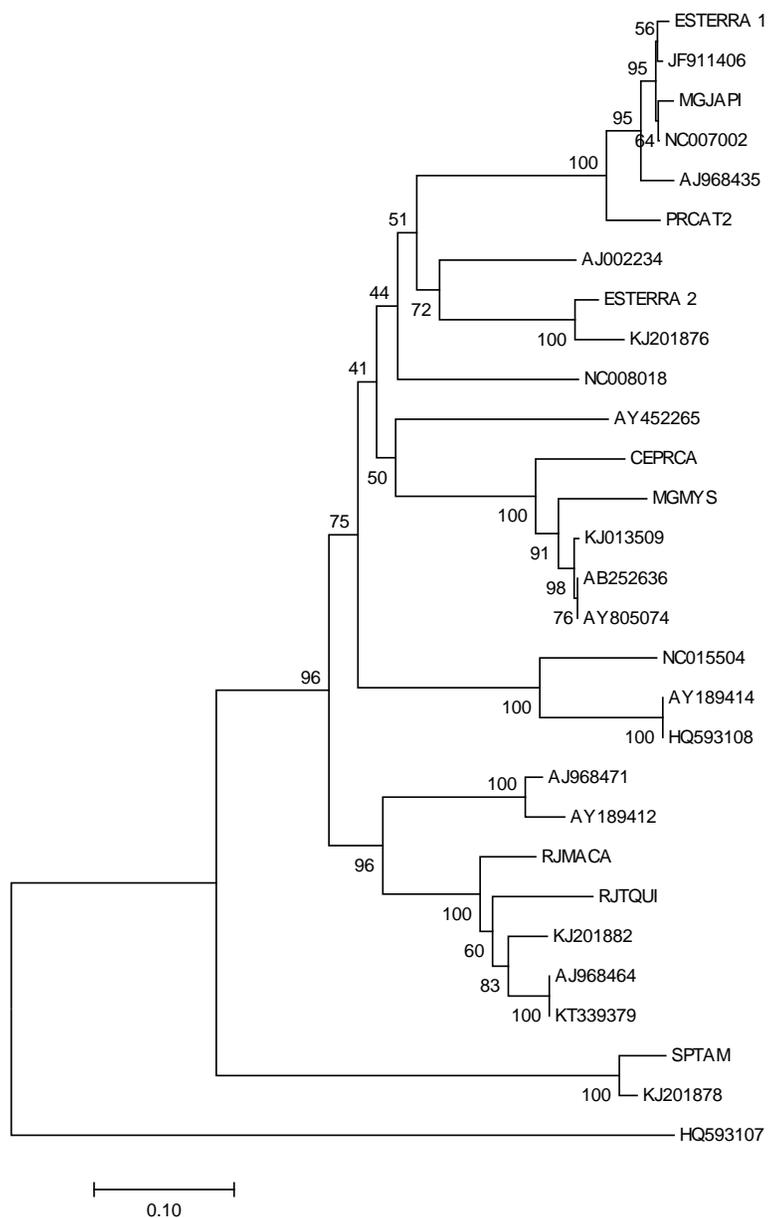


Figura 4 Cladograma construído com base na sequência de aminoácidos da região codificadora RT/RNaseH dos isolados de Badnavirus estudados juntamente com os do GenBank. Os valores foram obtidos pelo programa Mega 6.0 e teste neighbor-joining, com 3.000 repetições

No cladograma construído com base na sequência de nucleotídeos, os isolados brasileiros RJTQUI e RJMACA se agruparam com isolados AJ968464, KT339379 e KJ201882, pertencentes à espécie BSUCV. O isolado SPTAM se agrupou no mesmo subclado do isolado brasileiro KJ201878, próximo ao segundo subclado dos isolados pertencentes à espécie BSUGV. Os isolados PCRCAT2, MGJAPI e ESTERRA1 se agruparam próximos, no mesmo subclado em que se agruparam os isolados pertencente à espécie BSGFV. O ESTERRA2 se agrupou com o isolado brasileiro BSBV, próximo ao isolado BSOLV e, finalmente, CEPRCA e MGMYS se agruparam com outros isolados pertencentes à espécie BSMYV. Isolados de outras espécies ficaram claramente separados em subclados distintos. O clado construído com base na sequência de aminoácidos mostrou a mesma tendência de agrupamento dentro das espécies de *Badnavirus*. Nesse cladograma, o isolado SPTAM ficou completamente isolado em um subclado, juntamente com o outro isolado brasileiro KJ201878. O isolado BSUGV ficou separado em outro subclado, agrupado com a sequência endógena AY189412.

De modo geral observou-se que as espécies não se encontram isoladas em regiões distintas do Brasil, ou seja, BSMYV foi encontrada no Ceará e em Minas Gerais, e GF no Espírito Santo, Minas Gerais e Paraná. A ESTERRA2, classificada como BSBV, encontrada no Espírito Santo, também já havia sido encontrada no Paraná. Isso pode ser explicado pelo grande trânsito de material que, geralmente, ocorre no Brasil.

A forma atual de propagação de mudas no país, principalmente por cultura de tecidos, requer especial atenção do setor de vigilância fitossanitária, em face não só dessa grande variabilidade de espécies de *Badnavirus* que podem infectar a bananeira, mas também da possibilidade de infecções latentes que podem ocorrer quando o vírus que se encontra integrado ao genoma da planta não está se expressando na sua forma episomal. Conhecer as estirpes que

ocorrem no país é, então, de grande importância para subsidiar os métodos de indexação de mudas, visando impedir a propagação de plantas infectadas.

## 7 CONCLUSÃO

Foi possível diagnosticar infecção episomal de BSV em 31 amostras obtidas de sete estados brasileiros. A técnica *Rolling circle amplification* foi eficiente na diferenciação das sequências integradas e episomais do BSV.

Existe grande variabilidade dentro do complexo *Banana streak virus* no Brasil. A espécie BSMYV foi encontrada em materiais coletados no Ceará e em Minas Gerais; a BSGFV, no Espírito Santo, Paraná e Minas Gerais; a BSUCV, no Rio de Janeiro; a BSUGV, em São Paulo e a BSBVAV, no Espírito Santo, indicando ampla distribuição dessas espécies pelo país.

A espécie *Banana streak Brazilian A virus*, que já havia sido encontrada no Paraná em levantamentos anteriores, foi novamente detectada no Espírito Santo, indicando que essa espécie, ainda não reconhecida, deve estar circulando pelo Brasil.

## REFERÊNCIAS

ALVES, E. J. **A cultura da banana: aspectos técnicos, socioeconômicos e agroindustriais**. 2. ed. Brasília: EMBRAPA-SPI; Cruz das Almas: EMBRAPA-CNPMF, 1999. 585 p.

ALVES, P. C. M. S. **Detecção e caracterização molecular de isolados de *Banana streak virus* (BSV) no Brasil**. 2013. 74 p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2013.

BERTSCH, C. et al. Retention of the virus-derived sequences in the nuclear genome of grapevine as a potential pathway to virus resistance. **Biology Direct**, London, v. 21, n. 4, p. 1-11, June 2009.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa nº 29**, de 29 de fevereiro de 2012. Brasília, 2012. Disponível em: <<http://www.jusbrasil.com.br/diarios/34824181/dou-secao-1-01-03-2012-pg-10>>. Acesso em: 10 dez. 2015.

BRIOSO, P. S. T. Detecção e controle do vírus das estrias e do mosaico da bananeira. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE BANANICULTURA, 2003, Paracatu. **Anais...** Cruz das Almas: Nova Civilização, 2003. p. 94-100.

BRIOSO, P. S. T. et al. Infecção mista em bananeiras pelo vírus do mosaico do pepino (*Cucumber mosaic virus*-CMV) e da risca da bananeira (*Banana streak virus*-BSV) no Brasil. **Summa Phytopathologica**, Jaguariuna, v. 26, n. 2, p. 255-257, 2000.

BRIOSO, P. S. T.; PEREIRA, J. C. R.; GASPAROTTO, L. Ocorrência de badnavirus em frutos de bananeira no estado do Amazonas, Brasil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 33, n. 4, p. 1353-1355, 2011.

CHABANNES, M.; ISKRA-CARUANA, M. L. Endogenous pararetroviruses: a reservoir of virus infection in plants. **Current Opinion in Virology**, Houston, v. 3, n. 6, p. 615-620, Dec. 2013.

COLARICCIO, A. et al. Detecção do *Banana streak virus* (BSV) em mudas de meristemas de banana importadas. **Summa Phytopathologica**, Jaguariuna, v. 32, p. S96-S97, 2006. Suplemento.

COTE, F. X. et al. Micropropagation by tissue culture triggers differential expression of infectious endogenous *Banana streak virus* sequences (eBSV) present in the B genome of natural and synthetic interspecific banana plantains. **Molecular Plant Pathology**, London, v. 11, n. 1, p. 137-144, Jan. 2010.

DAHALL, G. et al. Relationship between natural occurrence of *Banana streak Badnavirus* and symptom expression, relative concentration of viral antigen, and yield characteristics of some micropropagated *Musa* spp. **Plant Pathology**, Honolulu, v. 49, n. 1, p. 68-79, Feb. 2000a.

DAHALL, G. et al. Studies on a Nigerian isolate of banana streak badnavirus: II., effect of intraplant variation on virus accumulation and reliability of diagnosis by ELISA. **Annals of Applied Biology**, Warwick, v. 132, p. 263-275, Apr. 1998.

DAHALL, G. et al. Symptomatology and development of *Banana streak*, a disease caused by *Banana streak virus Badnavirus*, under natural conditions in Ibadan, Nigeria. **Acta Horticulturae**, The Hague, v. 540, n. 1, p. 361-375, Oct. 2000b.

DALLOT, S. et al. Evidence that the proliferation stage of micropropagation procedure is determinant in the expression of *Banana streak virus* integrated into the genome of the FHIA 21 hybrid (*Musa* AAAB). **Archives of Virology**, New York, v. 146, n. 11, p. 2179-2190, Apr. 2001.

DANIELLS, J.; THOMAS, J. E.; SMITH, M. Seed transmission of *Banana streak virus* confirmed. **Info Musa**, Paris, v. 4, p. 1-7, 1995.

DANIELLS, J. W. et al. The effect of *Banana streak virus* on the growth and yield of dessert bananas in tropical Australia. **Annals of Applied Biology**, Warwick, v. 139, p. 51-60, Mar. 2001.

DEAN, F. B. et al. Rapid amplification of plasmid and phage DNA using Phi29vDNA polymerase and multiply-primed rolling circle amplification. **Genome Research**, Cold Spring Harbor, v. 11, n. 6, p. 1095-1099, June 2001.

D'HONT, A. et al. The banana (*Musa acuminata*) genome and the evolution of monocotyledonous plants. **Nature**, London, v. 488, n. 7410, p. 213-217, Aug. 2012.

FIGUEIREDO, D. et al. Detecção e análise da variabilidade de seqüências do *Banana streak virus* (BSV) em bananeiras no Brasil. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 32, n. 2, p. 118-123, abr./jun. 2006.

FIGUEIREDO, D. V.; BRIOSSO, P. S. T. PCR multiplex para a detecção de BSV e CMV em bananeiras micropropagadas. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 33, n. 3, p. 229-232, 2007.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **Faostat**: production/crops. Rome, 2013. Disponível em: <<http://faostat3.fao.org/browse/Q/QC/E>>. Acesso em: 28 dez. 2015.

FURUYA, N.; NATSUAKI, K. T. First report and molecular characterization of exogenous banana streak mysore virus from banana in Indonesia. **Asian Journal of Plant Pathology**, New York, v. 6, n. 2, p. 41-47, Aug. 2012.

GAMBLEY, C. F. et al. Identification of viral and non-viral reverse transcribing elements in pineapple (*Ananas comosus*), including members of two new *Badnavirus* species. **Archives of Virology**, New York, v. 153, n. 8, p. 1599-1604, Aug. 2008.

GAYRAL, P. et al. Evolution of endogenous sequences of *Banana streak virus*: what can we learn from banana (*Musa* sp.) evolution? **Journal of Virology**, Washington, v. 84, n. 14, p. 7346-7359, July 2010.

GAYRAL, P. et al. A single *Banana streak virus* integration event in the banana genome as the origin of infectious endogenous pararetrovirus. **Journal of Virology**, Washington, v. 82, n. 13, p. 6697-6710, July 2008.

GAYRAL, P.; ISKRA-CARUANA, M. L. Phylogeny of banana streak virus reveals recent and repetitive endogenization in the genome of its banana host (*Musa* sp.). **Journal of Molecular Evolution**, New York, v. 69, n. 1, p. 65-80, July 2009.

GEERING, A. D. et al. Banana contains a diverse array of endogenous *Badnaviruses*. **Journal of General Virology**, London, v. 86, p. 511-520, Jan. 2005a.

GEERING, A. D. et al. Characterisation of *Banana streak* Mysore virus and evidence that its DNA is integrated in the B genome of cultivated *Musa*. **Archives of Virology**, New York, v. 155, n. 4, p. 787-96, Apr. 2005b.

- GEERING, A. D.; SCHARASCHKIN, T.; TEYCHENEY, P. Y. The classification and nomenclature of endogenous viruses of the family *Caulimoviridae*. **Archives of Virology**, New York, v. 55, n. 1, p. 123-131, Jan. 2010.
- GEERING, A. D. W. et al. Analysis of the distribution and structure of integrated *Banana streak virus* DNA in a range of *Musa* cultivars. **Molecular Plant Pathology**, London, v. 2, n. 4, p. 207-213, July 2001.
- GEERING, A. D. W. et al. Genetic diversity among *Banana streak virus* isolates from Australia. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 90, n. 8, p. 921-927, Aug. 2000.
- HANSEN, C. N.; HARPER, G.; HESLOP-HARRISON, J. S. Characterisation of pararetrovirus-like sequences in the genome of potato (*Solanum tuberosum*). **Cytogenetic and Genome Research**, Würzburg, v. 110, n. 1/4, p. 559-565, July 2005.
- HARPER, G. et al. *Banana streak virus* is very diverse in Uganda. **Virus Research**, Amsterdam, v. 100, n. 1, p. 51-56, Mar. 2004.
- HARPER, G. et al. Detection of *Banana streak virus* in field samples of bananas from Uganda. **Annals of Applied Biology**, Warwick, v. 141, n. 3, p. 247-257, Mar. 2002.
- HARPER, G. et al. Detection of episomal *Banana streak Badnavirus* by IC-PCR. **Journal of Virology Methods**, Hong Kong, v. 79, n. 1, p. 1-8, Apr. 1999a.
- HARPER, G. et al. The diversity of *Banana streak virus* isolates in Uganda. **Archives of Virology**, New York, v. 150, n. 12, p. 2407-2420, 2005.
- HARPER, G. et al. Integration of *Banana streak Badnavirus* into the *Musa* genome: Molecular and cytogenetic evidence. **Virology**, London, v. 255, p. 207-213, 1999b.
- HARPER, G.; HULL, R. Cloning and sequence analysis of *Banana streak virus* DNA. **Virus Genes**, Norwell, v. 17, p. 271-278, 1998.
- HESLOP-HARRISON, J. S.; SCHWARZACHER, T. Domestication, genomics and the future for banana. **Annals of Botany**, Oxford, v. 100, n. 5, p. 1073-1084, Aug. 2007.

HULL, R. et al. Family *Caulimoviridae*. In: FAUQUET, C. M. et al. (Ed.). **Virus taxonomy: eight report of the international committee on taxonomy of viruses**. San Diego: Elsevier, 2005. p. 385-396.

HULL, R.; HARPER, G.; LOCKHART, B. Viral sequences integrated into plant genomes. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 40, n. 1, p. 362-365, Sept. 2002.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA.  
**Levantamento sistemático da produção agrícola**. Rio de Janeiro, 2014.  
Disponível em:  
<<http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/tabela/listabl.asp?c=188&z=t&o=26>>.  
Acesso em: 28 dez. 2015.

ISKRA-CARUANA, M. et al. The common evolutionary history of *Badnaviruses* and banana. **Infection, Genetics and Evolution**, Amsterdam, v. 21, n. 3, p. 83-89, Jan. 2014a.

ISKRA-CARUANA, M. L. et al. A fourpartner plant-virus interaction: enemies can also come from within. **Molecular Plant-Microbe Interactions Journal**, Saint Paul, v. 23, n. 11, p. 1394-1402, Nov. 2010.

ISKRA-CARUANA, M. L. et al. How to control and prevent the spread of *Banana streak* disease when the origin could be viral sequences integrated in the banana genome? **Journal of Virology**, Washington, v. 82, n. 13, p. 77-84, July 2008.

ISKRA-CARUANA, M. et al. A possible scenario for the evolution of Banana streak virus in banana. **Virus Research**, Amsterdam, v. 186, n. 19, p. 155-162, 2014b.

JAKOWITSCH, J. et al. Integrated pararetroviral sequences define a unique class of dispersed repetitive DNA in plants. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 96, p. 13241-13246, 1999.

JAMES, A. P. **Viruses of banana in East Africa**. 2011. 180 p. Thesis (Doctor of Philosophy) - Queensland University of Technology, Queensland, 2011.

JAMES, A. P. et al. Development of a novel rolling-circle amplification technique to detect *Banana streak virus* that also discriminates between integrated and episomal virus sequences. **Plant Disease**, Quebec, v. 95, n. 1, p. 57-62, Jan. 2011a.

JAMES, A. P. et al. Molecular characterisation of six *Badnavirus* species associated with leaf streak disease of banana in East Africa. **Annals of Applied Biology**, Warwick, v. 158, p. 346-53, 2011b.

JAUFEEERALLY-FAKIM, Y.; KHORUGDHARRY, A.; HARPER, G. Genetic variants of *Banana streak virus* in Mauritius. **Virus Research**, Amsterdam, v. 115, n. 1, p. 91-98, Jan. 2006.

JAVER, E. et al. Identification of *Banana streak virus* species Goldfinger, Imové, Mysore and Obino l'Ewaï in *Musa* spp. in Cuba. **Plant Pathology**, Honolulu, v. 58, n. 4, p. 787, Aug. 2009.

JAVER-HIGGINSON, E. et al. Occurrence, prevalence and molecular diversity of *Banana streak viruses* in Cuba. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 138, n. 1, p. 157-166, Jan. 2014.

JOHNE, R. et al. Rolling-circle amplification of viral DNA genomes using phi29 polymerase. **Trends in Microbiology**, Cambridge, v. 17, n. 5, p. 205-211, May 2009.

KARANJA, L. et al. Molecular Identification of *Banana streak virus* Isolates in Kenya. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 156, n. 11/12, p. 678-686, Dec. 2008.

KUBIRIBA, J. et al. Disease spread patterns of *Banana streak virus* in farmers' fields in Uganda. **Annals of Applied Biology**, Warwick, v. 139, n. 1, p. 31-36, 2001a.

KUBIRIBA, J. et al. Vector transmission of *Banana streak virus* in the greenhouse in Uganda. **Annals of Applied Biology**, Warwick, v. 139, n. 1, p. 37-43, Aug. 2001b.

KUNII, M. et al. Reconstruction of putative DNA virus from endogenous rice tungro bacilliform virus-like sequences in the rice genome: implications for integration and evolution. **BMC Genomics**, London, v. 80, n. 5, p. 1-14, Oct. 2004.

LAFLEUR, D.; LOCKHART, B.; OLSZEWSKI, N. E. Portions of the *Banana streak Badnavirus* genome are integrated in the genome of its host *Musa* sp. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 86, p. S100-S101, 1996. Supplement.

LANEY, A. G.; HASSAN, M.; TZANETAKIS, I. E. An integrated *Badnavirus* is prevalent in fig germplasm. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 102, n. 12, p. 1182-1189, Dec. 2012.

LASSOUDIÈRE, A. La mosaïquedite “a tirets” du bananier ‘Poyo’ en Côte d’Ivoire. **Fruits**, Paris, v. 29, p. 349-357, 1974.

LE PROVOST, G. et al. Improved detection of episomal *Banana streak viruses* by multiplex immunocapture PCR. **Journal of Virological Methods**, Amsterdam, v. 137, n. 1, p. 7-13, Oct. 2006.

LE PROVOSTET, F. et al. Molecular characterization of *Banana streak acuminata* Vietnam virus isolated from *Musa acuminata* siamea (banana cultivar). **Archives of Virology**, New York, v. 152, n. 7, p. 1409-1416, July 2007.

LI, L. F. et al. Origins and domestication of cultivated banana inferred from chloroplast and nuclear genes. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 8, n. 1, Nov. 2013. Disponível em: <<http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0080502>>. Acesso em: 10 dez. 2015.

LOCKHART, B. E. L. Purification and Serology of a Bacilliform Virus Associated with *Banana streak* Disease. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 76, p. 995-999, 1986.

LOCKHART, B. E. L.; OLSZEWSKI, N. E. Serological and genomic heterogeneity of *Banana streak Badnavirus*: implications for virus detection in *Musa* germplasm. In: GANRY, J. (Ed.). **Breeding banana and plantain for resistance to diseases and pests**. Montpellier: CIRAD/INIBAP, 1993. p. 105-113.

LODHI, M. A. et al. A simple and efficient method for DNA extraction from grapevine cultivars and *Vitis* species. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 12, n. 1, p. 6-13, 1994.

LOMBARDI, R.; HARAKAVA, R.; COLARICCIO, A. Cloning and purification of *Banana streak OL virus* coat protein fragment. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 45, n. 8, p. 811-817, ago. 2010.

MARINHO, V. L. A.; BATISTA, M. F. Interceptação, pelo serviço de quarentena de mudas, de vírus em mudas meristemáticas de bananeiras importadas. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 30, n. 5, p. 552, 2005.

MATZKE, A. J. M. Endogenous pararetroviruses of allotetraploid *Nicotiana tabacum* and its diploid progenitors, *N. sylvestris* and *N. tomentosiformis*. **Biological Journal of the Linnean Society**, London, v. 82, n. 4, p. 627-638, Aug. 2004.

METTE, M. F. et al. Endogenous viral sequences and their potential contribution to heritable virus resistance in plants. **EMBO Journal**, Oxford, v. 21, n. 3, p. 461-469, Feb. 2002.

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. **BLAST**. Disponível em: <<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>>. Acesso em: 10 maio 2015.

NDOWORA, T. et al. Evidence that *Badnavirus* infection in *Musa* can originate from integrated pararetroviral sequences. **Virology**, London, v. 255, p. 214-220, 1999.

NEI, M.; GOJOBORI, T. Simple methods for estimating the numbers of synonymous and nonsynonymous nucleotide substitutions. **Molecular Biology and Evolution**, Oxford, v. 3, n. 5, p. 418-426, Sept. 1986.

NOREEN, F. et al. Distinct expression of endogenous *Petunia* vein clearing virus and the DNA transposon dTph1 in two *Petunia hybrida* lines is correlated with differences in histone modification and siRNA production. **Plant Journal**, Oxford, v. 50, n. 2, p. 219-229, Apr. 2007.

PAHALAWATTA, V.; DRUFFEL, K.; PAPPU, H. A new and distinct species in the genus *Caulimovirus* exists as an endogenous plant pararetroviral sequence in its host, *Dahlia variabilis*. **Virology**, London, v. 376, n. 2, p. 253-257, 2008.

PALTRONIER, L. S. et al. Constatação do *Banana streak* Uganda B virus em bananeiras no estado do Pará. **Summa Phytopathologica**, Jaguariúna, v. 35, n. 1, p. 74, jan./fev. 2009.

PEREIRA, J. C. R.; MOREIRA, A.; GASPAROTO, L. Estado nutricional de bananeiras infectadas por estirpes de *Banana streakvirus* no Amazonas. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 28, p. S394, 2003. Suplemento.

RAJESWARAN, R. et al. Evasion of short interfering RNA-directed antiviral silencing in *Musa acuminata* persistently infected with six distinct banana streak pararetroviruses. **Journal of Virology**, Washington, v. 88, n. 19, p. 11516-11528, 2014.

REAGIN, M. J. et al. TempliPhi: a sequencing template preparation procedure that eliminates overnight cultures and DNA purification. **Journal of Biomolecular Techniques**, Bethesda, v. 14, n. 2, p. 143-148, June 2003.

RICHERT-POGGELER, K. R. et al. Induction of infectious petunia vein clearing (pararetro) virus from endogenous provirus in petunia. **EMBO Journal**, Oxford, v. 22, n. 18, p. 4836-4845, Sept. 2003.

SEAL, S. et al. The prevalence of *Badnaviruses* in West African yams (*Dioscorea cayenensis-rotundata*) and evidence of endogenous pararetrovirus sequences in their genomes. **Virus Research**, Amsterdam, v. 186, n. 19, p. 144-154, June 2014.

SHARMA, S. K. et al. Subpopulation level variation of banana streak viruses in India and common evolution of banana and sugarcane badnaviruses. **Virus Genes**, Norwell, v. 50, n. 3, p. 450-465, June 2015.

SILVA, S. O. et al. Melhoramento genético da bananeira: estratégias e tecnologias disponíveis. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 35, n. 3, p. 919-931, 2013.

SILVEIRA, D. G. et al. Efeitos do *Banana streak virus* no desenvolvimento de cultivares de bananeiras. **Summa Phytopathologica**, Jaguariuna, v. 33, n. 2, p. 190-191, abr./jun. 2007.

SILVEIRA, D. G. et al. Indexação biológica de genótipos de bananeira para o *Banana steak virus*. **Summa Phytopathologica**, Jaguariuna, v. 34, n. 2, p. 172-174, ago. 2008.

SIMMONDS, N. W. **Evolution of the bananas**. London: Longmans, 1962. 170 p.

SIMMONDS, N. W.; SHEPHERD, K. The taxonomy and origins of the cultivated bananas. **Journal of the Linnean Society of London, Botany**, London, v. 55, n. 359, p. 302-312, 1955.

STAGINNUS, C. et al. Endogenous pararetroviral sequences in tomato (*Solanum lycopersicum*) and related species. **BMC Plant Biology**, London, v. 7, n. 24, p. 1-16, Dec. 2007.

STAGINNUS, C. et al. Suggestions for a nomenclature of endogenous pararetroviral sequences in plants. **Archives of Virology**, New York, v. 154, n. 7, p. 1189-1193, July 2009.

STAGINNUS, C.; RICHERT-PÖGGLER, K. R. Endogenous pararetroviruses: two-faced travelers in the plant genome. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 11, n. 10, p. 485-494, Oct. 2006.

SU, L. et al. Complete genomic sequence of *Dracena mottle virus*, a distinct *Badnavirus*. **Virus Genes**, Norwell, v. 35, n. 2, p. 423-429, Oct. 2007.

UDE, G. et al. Analysis of genetic diversity and sectional relationship in *Musa* using AFLP markers. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 104, n. 8, p. 1239-1245, June 2002.

WAMBULWA, M. et al. Rolling circle amplification is more sensitive than PCR and serology-based methods in detection of *Banana streak virus* in *Musa* Germplasm. **American Journal of Plant Sciences**, Dover, v. 3, n. 11, p. 1581-1587, 2012.

YANG, I. C. et al. Sequence diversity of South Pacific isolates of Taro bacilliform virus and the development of a PCR-based diagnostic test. **Archives of Virology**, New York, v. 148, n. 10, p. 1957-1968, Oct. 2003.

ZHUANG, J. et al. Molecular characterization of *Banana streak virus* isolate from *Musa acuminata* in China. **Virologica Sinica**, Beijing, v. 26, n. 6, p. 393-402, Dec. 2011.