



DANIELE COSTA POMPEU

**LEVANTAMENTO E ESTUDO DAS ESPÉCIES
DE *BADNAVIRUS* QUE INFECTAM
BANANEIRAS NO BRASIL**

LAVRAS - MG

2014

DANIELE COSTA POMPEU

**LEVANTAMENTO E ESTUDOS DAS ESPÉCIES DE *BADNAVIRUS*
QUE INFECTAM BANANEIRAS NO BRASIL**

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

Orientadora

Dra. Antonia dos Reis Figueira

LAVRAS - MG

2014

**Ficha Catalográfica Elaborada pela Coordenadoria de Produtos e
Serviços da Biblioteca Universitária da UFLA**

Pompeu, Daniele Costa.

Levantamento e estudo das espécies de *badnavirus* que infectam
bananeiras no Brasil / Daniele Costa Pompeu. – Lavras : UFLA,
2014.

52 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2014.

Orientador: Antônia dos Reis Figueira.

Bibliografia.

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

CDD – 632.8

DANIELE COSTA POMPEU

**LEVANTAMENTO E ESTUDOS DAS ESPÉCIES DE *BADNAVIRUS*
QUE INFECTAM BANANEIRAS NO BRASIL**

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

APROVADA em 15 de agosto de 2014.

Dra Priscilla de Sousa Geraldino Duarte UFLA

Dr. Ricardo Magela de Souza UFLA

Dra. Antonia dos Reis Figueira
Orientador

LAVRAS - MG

2014

AGRADECIMENTOS

A Deus por estar ao meu lado me dando toda força para aceitar todas as dificuldades que aparecem durante a caminhada;

A minha mãe que foi e que é meu exemplo de vida que me ensinou a sempre ser forte;

Ao meu pai que lá de cima sempre esteve olhando por mim;

A Epifânio Porfiro Pires, companheiro de todas as horas, me ajudando, sempre me animando dando todo apoio e por seu grande carinho e paciência;

A Universidade Federal de Lavras (UFLA), por meio do Programa de Pós Graduação em Biotecnologia Vegetal por ter me proporcionado a oportunidade de realização do mestrado;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos;

A minha orientadora, professora Antonia dos Reis Figueira, por todo ensinamento e consideração. Muito obrigada pelo aprendizado e confiança.

A Priscilla de Sousa Geraldino Duarte, pela atenção e disponibilidade em todas as etapas do trabalho;

A Suellen Galvino Costa, por me acompanhar e instruir para a realização e execução dos experimentos;

As minhas irmãs Gisele e Aline sempre me ajudando. A toda minha família pelo carinho.

A Maria de Fátima Camilo Tomaz por sempre cuidar de mim.

A família de Epifânio, e em especial Maria da Conceição do Nascimento Pires, pelo carinho, amizade e apoio que me proporcionou;

Aos meus colegas de laboratório Luciana, Elisângela, Thaís, Nara, Marcelo, Maurício, Carzinho, Mirelly, Jéssica e Sanderson.

Aos membros da banca examinadora: professora Dra. Antonia dos Reis Figueira, Dra. Priscilla de Sousa Geraldino Duarte e Dr. Ricardo Magela de

Souza, por se disponibilizarem e lerem este trabalho e por todas as sugestões para a melhoria do mesmo;

Aos professores do programa de Biotecnologia Vegetal da UFLA, pelos ensinamentos transmitidos;

RESUMO

O *Banana streak virus* (BSV) é um dos principais vírus que afetam a bananeira no Brasil. Os sintomas da doença são variáveis apresentando desde estrias cloróticas no limbo foliar até desenvolvimento anormal dos cachos e morte a partir do ponto de crescimento. Devido à heterogeneidade genômica dos isolados de BSV e ao fato dele ter a propriedade de se incorporar no genoma da bananeira, a utilização de técnicas sorológicas e moleculares, para sua detecção, nem sempre apresenta a eficiência desejada, sendo de grande importância analisar a variabilidade de isolados deste vírus no Brasil, para que medidas de prevenção e diagnose sejam bem estabelecidas para no país. Nesse contexto, o objetivo desse trabalho foi analisar os genomas de isolados coletados em diferentes regiões produtoras do país, com base no seu perfil de restrição enzimática e na sequência da região RT /RNase H. O DNA total das plantas foi extraído a partir do tecido foliar e amplificado por RCA, usando o Illustra TempliPhi 100 Amplification Kit. A região do genoma a ser analisada, contendo 540 Kb foi amplificada por PCR a partir dos produtos do RCA, purificada e enviada para sequenciamento. A clivagem enzimática dos produtos do RCA foi feita empregando as seguintes enzimas: EcoRI, KpnI, PstI, SacI, XbaI, XhoI. A análise genômica dos 13 isolados virais, com base no critério do ICTV de classificação de *Badnavirus*, possibilitou a identificação de 2 espécies já descritas, sendo que 10 foram classificados como Banana streak Mysore virus, 1 como *Banana streak obino I' Ewai virus* (BSOLV) e 2 apresentaram similaridade menor que 80% quando comparados com as espécies de *Badnavirus* já aprovadas pelo ICTV. A análise do perfil de restrição não foi consistente com os dados encontrados na literatura, não se mostrando adequado para classificação das espécies, enquanto que a análise da sequência da região RT /RNase H permitiu uma classificação segura dentro dos padrões já estabelecido para os *Badnavirus*.

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

ABSTRACT

Banana streak virus (BSV) is one of the main virus that affect bananas in Brazil. The symptoms of the disease are variable, presenting from chlorotic streaks on the foliar limb to the abnormal development of banana bunches and death, beginning at the point of growth. Due to the genomic heterogeneity of the BSV isolates and to the fact that it presents the property of incorporating to the banana genome, the use of serologic and molecular techniques for its detection not always presents the desired efficiency, being of great importance to analyze the variability of the isolated of this virus in Brazil in order for prevention and diagnosis measures to be well established for the country. In this context, we aimed at analyzing the genomes of isolates collected in different producing regions of the country, based on its enzyme restriction profile and on the sequence of the RT/RNase H. The viral dsDNA was obtained with the extraction of the total DNA of the plants, from the foliar tissue and amplified using the Illustra TempliPhi 100 Amplification Kit (GE Healthcare, Buckinghamshire, United Kingdom). The conserved region of the *Badnavirus* used for differentiating species was amplified by the PCR, purified and sent for sequencing. The genomic DNA obtained by the RCA reaction was submitted to cleavage with the following enzymes: EcoRI, KpnI, PstI, SacI, XbaI, XhoI. The analyses of the 540pbs fragments amplified by PCR, of the 13 BSV isolates based on the ICTV variant classification criteria, allowed the identification of 2 BSV variants, with 10 being classified as *Banana streak Mysore virus*, 1 as *Banana OL virus*, 2 presented high similarity to *Musa acuminata* (genotype AA). The analysis of the restriction profile was not consistent with the data found in literature, not being adequate for classifying the species, while the sequence analysis of the RT/RNase H region allowed a safe classification inside the standards already established for the *Badnavirus*.

Keywords: *Banana streak virus*. RT/RNase. RCA.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Organização do genoma de BSV	18
Figura 2	Mecanismo de amplificação do DNA circular pela técnica Rolling circle com o uso da polimerase Phi29	22
Figura 3	Árvore Filogenética construída com base na sequência de nucleotídeos da região codificadora RT/RNAseH dos isolados de <i>Badnavirus</i> estudados. Os valores foram obtidos pelo programa Mega 6.0 e teste neighbor-joining, com 2.000 repetições.....	37
Figura 4	Árvore Filogenética construída com base na sequência de aminoácidos da região codificadora RT/RNAseH dos isolados de <i>Badnavirus</i> estudados. Os valores foram obtidos pelo programa Mega 6.0 e teste neighbor-joining, com 2.000 repetições.....	38
Figura 5	Árvore Filogenética construída com base na sequência de nucleotídeos da região codificadora RT/RNAseH dos isolados de <i>Badnavirus</i> estudados juntamente com os do GenBank. Os valores foram obtidos pelo programa Mega 6.0 e teste neighbor-joining, com 2.000 repetições	39
Figura 6	Árvore Filogenética construída com base na sequência de aminoácidos da região codificadora RT/RNAseH dos isolados de <i>Badnavirus</i> estudados juntamente com os do GenBank. Os valores foram obtidos pelo programa Mega 6.0 e teste neighbor-joining, com 2.000 repetições	40
Figura 7	Análise eletroforética (A, B e C) dos produtos da restrição enzimática realizados com o genoma dos isolados AMCONQ 7, AMTAPM 15, e BAPAN	43

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Relação dos isolados coletados que foram positivos nos testes de RCA e submetidos ao sequenciamento e análise	24
Tabela 2	Primers empregados para a amplificação do genoma do <i>Banana streak virus</i> (BSV) pela técnica de RCA	26
Tabela 3	Isolados disponíveis no GenBank empregados para comparação com os isolados brasileiros	28
Tabela 4	Porcentagem (%) de identidade entre as sequências de nucleotídeos da região codificadora dos isolados do Brasil com GenBank.....	30
Tabela 5	Porcentagem (%) de identidade entre as sequências de aminoácidos da região codificadora dos isolados do Brasil com GenBank.....	34

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	REFERENCIAL TEÓRICO	14
2.1	A Bananeira	14
2.2	Viroses da bananeira	15
2.2.1	<i>Cucumber mosaic virus</i>	16
2.2.2	<i>Banana streak virus</i>	17
3	MATERIAL E MÉTODOS	23
3.1	Condução dos experimentos	23
3.2	Obtenção do material vegetal	23
3.3	Extração do DNA total	23
3.4	Rolling Circle Amplification (RCA)	25
3.5	PCR	25
3.6	Restrição enzimática	26
3.7	Sequenciamento e Análise das sequências	27
4	RESULTADOS e DISCUSSÃO	28
4.1	Resultados da restrição enzimática	41
5	CONCLUSÕES	44
	REFERÊNCIAS	45

1 INTRODUÇÃO

O Brasil é o quinto maior produtor mundial de banana e apresenta uma área cultivada de aproximadamente 500 mil ha (AGRIANUAL, 2014). Devido à intensificação da produção dessa fruta, novas pragas e doenças têm sido identificadas, as quais causam uma redução significativa na produtividade (DAHAN et al., 2000). As cultivares de bananeiras são derivadas de duas espécies selvagens da família Musaceae, *Musa acuminata* e *Musa balbisiana*, que possuem o genoma A e B respectivamente (PRICE, 1995). Sendo assim, a escolha e a aquisição do material propagativo são fundamentais na implantação de um pomar, pois influenciam de forma direta na produção e produtividade das plantas (FARGETTE et al., 2006).

Até o momento, dois são os vírus encontrados em bananeira no país: o *Cucumber mosaic virus* (CMV) e o *Banana streak virus* (BSV) (BRIOSO et al., 2003). O CMV pertence ao gênero *Cucumovirus* e é transmitido na natureza por ferramentas e por afídeos, enquanto que o BSV pertence ao gênero *Badnavirus* e é transmitido na natureza por cochonilhas, porém, ambos podem também ser transmitidos por mudas infectadas. Tanto o BSV como o CMV são encontrados em todas as regiões produtoras de banana do mundo (FIGUEIREDO et al., 2007), e o seu controle deve ser de caráter essencialmente preventivo, uma vez que as plantas infectadas não podem ser recuperadas. Para isso, a diagnose desses vírus nas mudas destinadas ao plantio é essencial para evitar a ocorrência de epidemias no campo (MEISSNER FILHO & BRIOSO, 2000).

A diagnose do CMV não enfrenta maiores dificuldades, podendo ser feita por métodos sorológicos e/ou moleculares. Entretanto, a diagnose do BSV tem sido bastante complicada devido a dois fatores fundamentais: a sua alta variabilidade genética e a sua capacidade de se integrar no genoma da planta hospedeira (FIGUEIREDO et al., 2007).

Em todo o mundo, diversas variantes do BSV têm sido descritas, com base na região RT / RNase H da ORFIII. Até o momento, foram encontrados quatro variantes genéticos, propostos como novas espécies, já reconhecidas pelo International Committee on Taxonomy of viruses (ICTV): *Banana streak obino I' Ewai virus* (BSOLV); *Banana streak Gold Finger virus* (BSGFV); *Banana streak Mysore virus* (BSMYV); *Banana streak Acuminata Vietnam* (BSVNV). Entretanto, à medida que novos isolados encontrados vão sendo sequenciados, novas variantes surgem, como *Banana streak Cavendish virus* (BSCAV) (JAMES et al., 2011), *Banana streak Imové virus* (BSIMV) (GEERING et al., 2011) e *Banana streak Uganda A-M virus* (JAMES et al., 2011a), etc. Isso tem dificultado a classificação taxonômica desse vírus, e algumas vezes elas são chamadas de espécies de BSV, quando na verdade o BSV é uma espécie e não um gênero. No Brasil pouco se sabe a respeito dos variantes que podem estar presentes, pois nenhuma caracterização molecular dos isolados encontrados no campo foi realizada até o momento.

O BSV, como outros membros da família Caulimoviridae, tem como peculiaridade a capacidade de integrar-se ao genoma da bananeira, embora essa integração não seja essencial para a replicação viral (HULL & COVEY, 1996). As sequências integradas são denominadas sequências endógenas de pararetrovírus (EPRVs), podendo ser de dois tipos: sequências virais não infecciosas com ORFs não funcionais, possuindo códons de terminação prematuros, mutações e/ou genomas virais incompletos; e sequências completas do DNA viral, que podem ser ativadas, transformando-se em um vírus funcional, que no caso do BSV são denominadas eaBSVs (GEERING et al., 2005; GAYRAL et al., 2008; GAYRAL et al., 2010). As sequências do tipo EPRVs têm sido encontradas em ambos os tipos de genoma de banana (A e B), enquanto que as do tipo eaBSVs tem sido encontradas apenas no genoma do tipo B (GEERING et al., 2005; GAYRAL et al., 2010; JAMES et al., 2011a).

Nesse contexto, a alta variabilidade do BSV implica na impossibilidade de se empregar testes sorológicos, pois podem gerar falsos negativos caso os antissoros empregados não reconheçam o variante genético que está presente na muda de bananeira. Por outro lado, o fato de se integrar no genoma da bananeira de modo completo e incompleto pode levar a resultados falsos positivos, levando ao descarte de mudas de alto valor comercial (JAMES et al., 2011a; JAMES et al., 2011b).

Tendo em vista a grande heterogeneidade do BSV, a dificuldade de sua detecção em mudas de bananeira e a falta de informações sobre os isolados existentes no Brasil o objetivo desse trabalho foi coletar e analisar os genomas de isolados coletados em diferentes regiões produtoras do Brasil, visando conhecer as espécies atualmente presentes em território brasileiro.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 A Bananeira

A bananeira é uma das mais antigas culturas, sendo o seu fruto conhecido e consumido em todo o mundo (HARPER et al., 2002; GEERING et al., 2005; DANTAS et al., 2011). Ela tornou-se de grande importância na dieta de populações, por ser fonte de carboidratos, vitamina C, potássio e fibras e ser livre de gordura, colesterol e sódio (NOMURA et al., 2013).

As cultivares de bananeiras são derivadas de duas espécies selvagens da família Musaceae, *Musa acuminata* e *Musa balbisiana*, que possuem o genoma A e B respectivamente (PRICE, 1995). Atualmente, existe em todo o mundo cultivares com genoma diploide, triploide ou tetraploide, resultando nos seguintes grupos: AA, BB, AB, AAA, AAB, ABB, AAAA, AAAB, AABB E ABBB (ALVES, 1999). No Brasil pode-se encontrar um grande número de cultivares de bananeiras (Nanica, Nanicão, Grande Naine, Prata Anã, Pacovan, Maçã, Terra, entre outras) que possuem as características desejáveis como porte da planta, produtividade, tolerância a pragas, doenças, seca e frio, o que pode ou não favorecer a produção e a comercialização. Esta grande variação permite que o produtor possa escolher cultivares que sejam da preferência do consumidor em relação à aparência e sabor da fruta (NOMURA et al., 2013; SILVA et al., 2013) e que mantenham um bom desempenho agrônomico em relação à sua adaptabilidade às condições climáticas locais e à resistência a doenças (JAMES et al., 2011).

As bananeiras são inférteis e possuem uma genética limitada (JAMES et al., 2011). Devido a isso, o tempo para se obter uma cultivar promissora é relativamente longo, e muitas vezes a demanda dos consumidores não é atendida (SILVA et al., 2013). As características como a partenocarpia e a esterilidade

dificultam o melhoramento genético, que procura obter cultivares resistentes, precocidade de produção, elevada produtividade e qualidade dos frutos (PUA et al., 2003).

No entanto, as dificuldades apresentadas pelo melhoramento genético tradicional levaram ao desenvolvimento de modernas ferramentas da biologia molecular, permitindo assim ampliar os estudos genéticos em bananeiras (KOVACS et al., 2012). Uma vez caracterizado o gene de interesse, pertencente à bananeira ou a outros organismos, este pode ser introduzido no genoma da planta usando o método de biobalística ou o processo de transformação por *Agrobacterium*. Plantas transformadas têm sido alternativas atraentes para o controle de pragas e doenças (BECKER et al., 2000; SREERAMANAN et al., 2010; JAMES et al., 2011).

2.2 Viroses da bananeira

Os maiores problemas no cultivo da banana no Brasil são os baixos números de variedades comerciais, que apresentam resistência às principais pragas e doenças, e o manejo inadequado da cultura (ANDRADE et al., 2009).

Diversas doenças fúngicas e bacterianas podem afetar os bananais, sendo que as viroses são consideradas de grande importância por não possuírem controle curativo. Há algum tempo as viroses não eram consideradas um problema sério, mas, com o desenvolvimento dos métodos de produção de mudas a partir de poucas matrizes, tornou-se evidente a necessidade do uso de matrizes comprovadamente sadias (MEISSNER FILHO & BRIOSO, 2000; SILVA & CORDEIRO, 2000).

No Brasil, até o momento, os vírus encontrados infectando a bananeira no campo foram o *Cucumber mosaic virus* (CMV) e o *Banana streak virus* (BSV). Devido às condições ambientais e a presença abundante de vetores no

campo, durante todo o ano, constituindo fatores capazes de potencializar epidemias que podem levar a perdas significativas, o uso de medidas de controle preventivas, como a propagação de mudas sadias e a eliminação de hospedeiras naturais para os vírus, bem como de seus vetores, são essenciais para garantir a produtividade dessa cultura (MEISSNER FILHO & BRIOSO, 2000).

Uma das medidas preventivas empregadas atualmente é a produção de mudas por cultura de tecidos, visando à eliminação de patógenos. Entretanto, medidas importantes como a indexação dessas mudas devem ser tomadas, pois os vírus podem não ser eliminados, como ocorre com o BSV que possui seu genoma integrado no genoma da planta e pode ser ativado durante o processo de micropropagação (DAHAL et al., 1998; DALLOT et al., 2001; HARPER et al., 2002; COTÊ et al., 2010).

2.2.1 *Cucumber mosaic virus*

O *Cucumber mosaic virus* (CMV) é classificado taxonomicamente como uma espécie da família Bromoviridae, gênero *Cucumovirus*, com simetria isométrica e diâmetro entre 28-30nm. Seu capsídeo é composto por 180 subunidades protéicas com massa molecular de 24 KDa (FRANCKI et al., 1979; PALUKAITIS et al., 1992).

O CMV foi descrito pela primeira vez em 1930, infectando plantas de pepino. A partir de então, teve uma ampla disseminação mundial atingindo plantas frutíferas, olerícolas e ornamentais (PALUKAITIS et al., 1992, VARVERI & BOUTSIKA, 1999). No Brasil sua primeira ocorrência foi em São Paulo, causando sintomas de mosaico, necrose e morte em bananeira (BRIOSO, 1986). Com o passar do tempo, este vírus tem adquirido uma grande importância, tanto pela ampla gama de hospedeiras que infecta quanto pelo elevado número de variantes genéticos (VARVERI & BOUTSIKA, 1999). A

transmissão do CMV na natureza pode ser feita por várias espécies de afídeos, de maneira semipersistente, sendo que os principais transmissores têm sido o *Aphis gossypii* e o *Myzus persicae* (PALUKAITIS et al., 1992, SILVA et al., 2013). Sua detecção é relativamente simples, podendo ser realizada tanto pelo teste sorológico ELISA como por testes moleculares mais sensíveis como o RT – PCR (LOCHART; JONES, 2000).

2.2.2 *Banana streak virus*

O *Banana streak virus*, foi relatado por volta de 1958, na Costa do Marfim, tendo sido inicialmente confundido com o mosaico da bananeira, geralmente induzido pelo CMV. Somente em 1974 foi relatado pela primeira vez no Marrocos, como sendo um vírus distinto do CMV (LOCKHART & JONES, 2000). Em seguida a doença foi registrada em vários continentes como África, América do Sul e regiões do Pacífico, mas, provavelmente, deve ocorrer em todos os locais onde se cultiva a banana no mundo (LOCKHART & JONES, 2000). No Brasil sua primeira identificação foi em infecção mista com o CMV, por Briosio et al. em 2000.

O BSV pertence à família Caulimoviridae, gênero *Badnavirus*, e é um pararetrovírus, de modo que, durante a replicação, inicialmente o seu genoma é transcrito em um RNA mensageiro, sintetizado a partir do genoma original, e a partir desse é retro-transcrito para DNA pela transcriptase reversa. As partículas virais são baciliformes, não envelopadas, medindo de 120 a 150nm de comprimento e 23 a 30 nm de diâmetro. O seu genoma é constituído por um DNA circular, de cadeia dupla, com aproximadamente 7.2 a 7.8 Kbp (HULL et al., 2005), e possui três ORFs (Open Reading Frame). As ORFI e ORFII codificam duas pequenas proteínas de 22,8 KDa e 14,5 KDa respectivamente, cujas funções não são bem conhecidas (CHENG et al., 1996). A ORFIII codifica

uma poliproteína, que posteriormente é clivada em cinco outras proteínas com as seguintes funções: proteína de movimento, capa protéica, protease aspártica, transcriptase reversa (RT) e ribonuclease H (RNase H) (HULL, 2002) (Figura1).

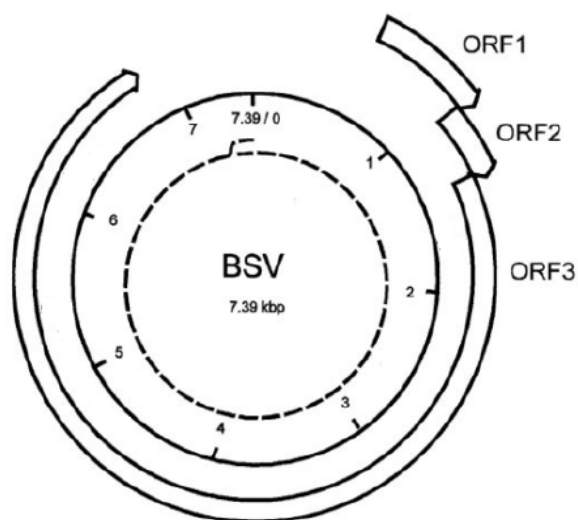


Figura 1 Organização do genoma de BSV

Nota: O círculo completo representa a dupla fita de DNA. O círculo interno pontilhado mostra o mapeamento de transcritos. E o outro arco demonstra a posição das ORF's.

(Fonte: HARPER; HULL, 1998).

O BSV não é transmitido mecanicamente, entretanto, na natureza é transmitido pelas cochonilhas *Planococcus citri* Risso, *Saccharicoccus sacchari* Cockerell e *Planococcus minor* Maskell, de modo semi-persistente. Apesar das cochonilhas serem sedentárias, os seus estádios iniciais são móveis e a transmissão é realizada facilmente (JAMES et al., 2011, COLARICCIO, 2006). Além dos vetores, o BSV pode expressar o genoma incorporado, induzido principalmente por cultura de tecidos (COLARICCIO, 2006). Os sintomas da doença são variáveis apresentando estrias cloróticas e necróticas ao longo do

limbo foliar, distorção de folhas e pecíolos, rachaduras no caule, desenvolvimento anormal dos cachos e morte do ponto de crescimento (DAHAL et al., 2000). Estes sintomas podem se apresentar em uma folha e/ou espalhar para as demais, podendo aumentar ou diminuir de maneira cíclica. Em vários casos as folhas emergentes aparecem assintomáticas, devido às condições ambientais e as variedades das bananeiras, sendo certas vezes exibidos durante a estação fria do ano (DAHAL, 1998; COLARICCIO, 2006).

O manejo adequado para BSV é a detecção antecipada e o conhecimento dos vetores do vírus para evitar que ocorra propagação e disseminação por cultura de meristemas. Além disso, pode haver uma movimentação de vírus entre as culturas através de vetores, pois existem *Badnavirus* que infectam as bananeiras e também cana-de-açúcar (COLARICCIO, 2006).

O uso de mudas sadias, obtidas por cultura de tecidos, poderia ajudar a evitar a introdução do BSV em bananais. Entretanto, o cultivo de tecidos *in vitro* ativa as sequências endógenas de BSV existentes no genoma da planta, o que destaca a necessidade de estudos que possibilitem um controle eficiente (GEERING et al., 2005).

Na classificação das espécies de *Badnavirus* estabelecida pelo Comitê Internacional de Taxonomia de vírus (ICTV), são consideradas espécies distintas aquelas que apresentam diferenças superiores a 20% na identidade de nucleotídeos, dentro da região conservada da ORFIII, contendo o gene que codifica a transcriptase reversa/ribonuclease H (RT/RNaseH) (HULL et al., 2005). De acordo com esse critério, diversas espécies têm sido descritas: *Banana streak OL virus* - BSOLV (HARPER & HULL, 1998), *Banana streak GOLD finger virus* - BSGFV (GAYRAL et al., 2008), *Banana streak IM virus* - BSIMV (GEERING et al., 2011), *Banana streak Mysore virus* - BSMYV (GEERING et al., 2005), *Banana streak acuminata Vietnam virus* - BSVNV

(LHEUREUX et al., 2007), *Banana streak CA virus* - BSCAV, *Banana streak Uganda A virus* - BSUAV (JAMES et al., 2011).

O *Banana streak virus*, além de possuir alta variabilidade genética tem como peculiaridade a característica de integrar-se ao genoma de plantas hospedeiras. Existem dois tipos de sequências integradas ao genoma da planta hospedeira: as incompletas, não infecciosas as plantas, e completas, que podem transformar-se em vírus funcional, sendo denominadas de eaBSVs (GEERING et al., 2005; GAYRAL et al., 2008; GAYRAL et al., 2010). As sequências endógenas de pararetrovirus (EPRVs) variam de pequenos fragmentos a sequências maiores, contendo mais de uma cópia no genoma (GAYRAL et al., 2010).

A forma como ocorre a integração entre o genoma do vírus e o da planta ainda é desconhecida, mas considera-se que seja através de recombinação ilegítima (GAYRAL et al., 2010). Através das células germinativas de certas plantas as sequências virais podem ser integradas e tornar-se parte de seu genoma, assim sendo inseridas na população por meio de seleção natural e/ou deriva genética (GAYRAL et al., 2010).

A presença de EPRVs tem sido considerada importante para as plantas hospedeiras, agindo na modificação do tamanho e alterações na metilação do seu genoma e atuando como reorganizador genômico por indução de rearranjos cromossomais. Além disso, exercem a função de facilitar a resistência da planta hospedeira ao vírus (GAYRAL et al., 2010). Estas sequências sobre determinadas condições de estresse, como hídrico, e por cultura de tecidos, podem levar a eventos de recombinação nas sequências integradas dando origem a infecções episomais (JAMES et al., 2011a).

Inicialmente a detecção de BSV foi realizada através de métodos sorológicos, no entanto, a sua alta variabilidade genômica representa um grande desafio para o desenvolvimento de testes de diagnóstico à base de anticorpos

(GEERING et al., 2000; HARPER et al., 2002; GEERING et al., 2005). O desenvolvimento de testes de diagnose baseados na PCR, para os *Badnavirus* tem como alvo a região conservada localizada na ORFIII, que codifica a proteína com função de RT/RNaseH (BRAITHWAITE et al., 1995; YANG et al., 2003). Entretanto, sequências integradas de *Badnavirus*, que podem ser completas e incompletas, comprometem a confiabilidade desse teste, que pode gerar falsos positivos (HARPER et al., 2002).

Em uma tentativa de contornar a detecção do DNA integrado, a imunocaptura (IC)-PCR foi empregada para a indexação de BSV, mas este método também depende da utilização de antissoros que podem não reconhecer todos os variantes genéticos desse vírus (HARPER et al., 2002). Uma técnica denominada “rolling circle amplification” (RCA), capaz de superar essas limitações, foi proposta por James et al. (2011b). Ela discrimina entre sequências de DNA do BSV integrado (EPRVs) e epissomal (eaBSVs), pois usa a DNA polymerase de bacteriófago Phi29, que amplifica moléculas circulares de DNA, incluindo plasmídeos (DEAN et al., 2001; REAGIN et al., 2003) e diversos vírus que infectam humanos, animais e plantas (JOHNE et al., 2009). James et al. (2011b), descrevem o desenvolvimento e uso da RCA para a detecção do BSV em banana e demonstram a habilidade desse método para diferenciar sequências integradas e epissomais do BSV.

Durante a reação de RCA os primers se ligam com o DNA molde em múltiplos locais. A polimerase Phi29 estende cada um dos primers dando origem a síntese da cadeia complementar, ao atingir o início da fita sinalizada por outro primer ela desloca essa fita e continua o processo de amplificação. O processo é contínuo resultando em uma amplificação exponencial (Figura 2).

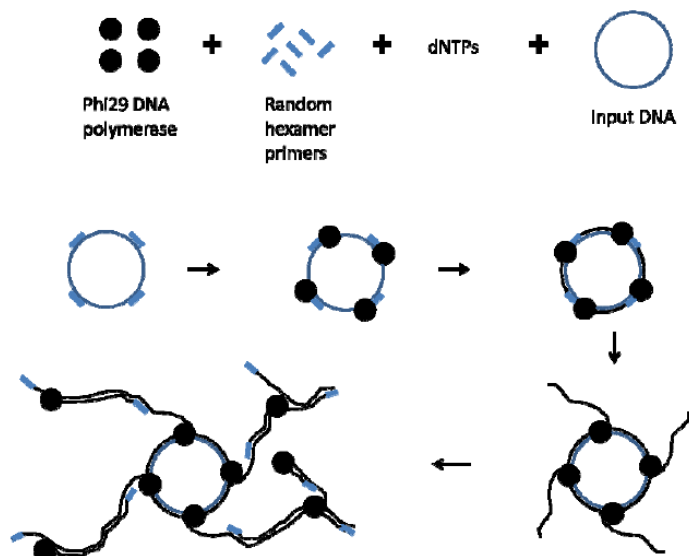


Figura 2 Mecanismo de amplificação do DNA circular pela técnica Rolling circle com o uso da polimerase Phi29

(Fonte: JAMES, 2011).

Técnicas que aplicam marcadores moleculares vêm sendo utilizadas para estudos da diversidade genética (SILVA et al., 2013). A RFLP se baseia no corte do DNA genômico com várias enzimas de restrição, que geram uma variação de fragmentos obtidos, a fim de, contribuir para a taxonomia de diversos organismos (SREERAMANAN et al, 2010). James et al., 2011 propôs o uso de diferentes endonucleases, que possibilitariam a obtenção de padrões de restrição enzimática para cada variante de BSV.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Condução dos experimentos

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Virologia Molecular, no Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Lavras (UFLA).

3.2 Obtenção do material vegetal

Os 13 isolados de BSV sequenciados nesse trabalho foram coletados de regiões distintas do país (Tabela 1), com o auxílio de produtores e pesquisadores comprometidos com a produção de banana. No momento do recebimento das amostras, parte do tecido foi submetido à extração de DNA total e o restante foi acondicionado em freezer -80°C.

3.3 Extração do 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 0,15g de tecido vegetal fresco na presença de nitrogênio líquido e em seguida foram adicionados 1,5ml de tampão CTAB 2% (100mM Tris-HCL, pH8,0; 20 mM EDTA; 1,4M NaCl; 80 mM Na₂SO₃; 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 após, foi adicionado igual volume do extrato a 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 armazenada a -20°C por 1 hora. Após a precipitação foi realizada uma centrifugação de 12000 rpm por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* lavado com 500 µl de álcool 70% e secado em temperatura ambiente. Em seguida o *pellet* seco foi ressuspenso em 30 µl de tampão TE (Tris HCL 1M pH 8.0, EDTA 0.5M 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.) .

Tabela 1 Relação dos isolados coletados que foram positivos nos testes de RCA e submetidos ao sequenciamento e análise

Nº da Amostra	Genótipo	Cultivares	Município	Estado	Denominação dos isolados*
1	AAB	Brs conquista	Manaus	Amazonas	AM-CONQ5
2	AAB	Brs conquista	Manaus	Amazonas	AM-CONQ6
3	AAB	Brs conquista	Manaus	Amazonas	AM-CONQ7
4	AAB	Brs conquista	Manaus	Amazonas	AM-CONQ10
5	AAB	Tap Maeo	Manaus	Amazonas	AMTAPM 15
6	AAB	Tap Maeo	Manaus	Amazonas	AMTAPM 19
7	AA	Jari buaya	Cruz das almas	Bahia	BA-JABU
8	AAB	Prata anã	Cruz das almas	Bahia	BA- PAN
9	AAAB	Brs platina	Sete Lagoas	Minas Gerais	MGBRPL
10	AAB	Mysore	Delfinópolis	Minas Gerais	MG-MYS 1
11	AAB	Mysore	Delfinópolis	Minas Gerais	MG-MYS 2
12	AAB	Mysore	Delfinópolis	Minas Gerais	MG-MYS 3
13	AAB	Mysore	Delfinópolis	Minas Gerais	MG-MYS 4

3.4 Rolling Circle Amplification (RCA)

O dsDNA foi amplificado usando o Illustra TempliPhi 100 Amplification Kit (GE Healthcare, Buckinghamshire, Reino Unido), seguindo as instruções do fabricante, com pequenas modificações. Ao invés de um par de primers foi empregada uma mistura contendo os 11 primers discriminados na Tabela 2. O produto obtido foi analisado em gel de agarose 0,7%, contrastado com Gel Red (Biotium Corp.).

3.5 PCR

A região conservada dos *Badnavirus* RT/RNaseH, utilizada para diferenciação de espécies, foi amplificada por PCR a partir dos produtos obtidos em RCA, empregando os dois primers específicos BadnaFP e BadnaFR (Tabela 2). Para a PCR (25µl) foi preparado uma mistura contendo 5µl de tampão 2x (GoTaq Green Master Mix); 0,75 µl de cada primer; 1,5 MgCl₂; 1µl de dNTP; 14,875 água ultra pura; 0,125 enzima e 1µl do DNA obtido como produto na reação anterior de RCA. Na PCR foi empregado o ciclo constituído por uma desnaturação inicial de 95°C durante 2 min, seguido por 35 ciclos de 95°C durante 45 s, 50°C por 1 min e 72°C durante 1 min e uma extensão final de 72°C durante 5 min. O produto da PCR foi analisado por eletroforese em gel de agarose a 0,7%, contrastado com Gel Red (Biotium Corp.). Os fragmentos foram purificados por meio do kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega), seguindo as instruções do fabricante, e enviados para sequenciamento.

Tabela 2 Primers empregados para a amplificação do genoma do *Banana streak virus* (BSV) pela técnica de RCA

Primers	Sequências 5' – 3'	Referência
1A	CTNTAYGARTGGYTNGTNATGCCNTTYGG	Harper et al. (2002)
4'	TCCAYTTRCANAYNSCNCCCANCC	Harpe et al. (2002)
BADNAF/P	ATGCCITTYGGIITIAARAAYGCICC	Yang et al. (2003)
BADNAR/P	CCAYTTRCAIACISICCCCAICC	Yang et al. (2003)
BSV2292	ATGARYTAHATWAGRTGYTMSCC	James et al. (2011a)
BSV2826	TYYWGAAARCATGGTGGGRGARGA	James et al. (2011a)
BSV3298	YTCCCACTTTTCRAAKACYTT	James et al. (2011a)
BSV3517	KRATMTTYTWYTDGAARATCC	James et al. (2011a)
BSV3700	KTGGBAGTTTKGTRAAGARYTC	James et al. (2011a)
BSV4030	TGCARRTYGTWYGCYTGYYGAGA	James et al. (2011a)
BSV6652	GAAAARRTMTGYGCNTAYGCVAG	James et al. (2011a)

3.6 Restrição enzimática

O DNA genômico, amplificado por RCA, foi submetido à clivagem com as seguintes enzimas: EcoRI, KpnI, PstI, SacI, XbaI, XhoI (PROMEGA) seguindo o método proposto James et al. (2011). Em seguida, os fragmentos obtidos foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1%, contrastado com GelRed™ (Biotium Corp.). O padrão de bandas de cada isolado foi analisado e comparado aos padrões encontrados na literatura.

3.7 Sequenciamento e Análise das sequências

O sequenciamento foi realizado pela companhia GeneWiz, dos Estados Unidos. A análise das sequências obtidas foi realizada utilizando-se o NCBI BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) e o alinhamento das sequências de nucleotídeos e aminoácidos foi feito por meio do programa CLUSTAL W2 (V. 2.0). Os isolados do GenBank empregados para comparação se encontram discriminados na Tabela 3, sendo que as relações filogenéticas foram estudadas utilizando-se o algoritmo neighbor-joining para aminoácidos e UPGMA para nucleotídeos, empregando o bootstrap com 2.000 repetições com o programa MEGA 6.0 (TAMURA et al., 2007).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A utilização dos primers BADNAFP e BADNARP na PCR permitiu a amplificação de fragmentos genômicos com 540pb, correspondente à região codificadora RT/RNaseH, para os 13 isolados estudados. As sequências de nucleotídeos e de aminoácidos desses isolados foram comparadas entre si e com outros dezesseis isolados do GenBank.

Quando os nucleotídeos dos isolados brasileiros foram comparados entre si eles apresentaram identidades entre 59 e 100% Tabela 4. Identidades acima de 90 % ocorreram entre os isolados: AMCONQ5, AMCONQ6, AMCONQ10, do Estado do Amazonas, BAPAN da Bahia e MGBRPL, MGMYS1, MGMYS2, MGMYS3 e MGMYS4 de Minas Gerais, indicando que eles devem pertencer à mesma espécie, de acordo com o critério estabelecido pelo ICTV (Harper et al., 2005).

Tabela 3 Isolados disponíveis no GenBank empregados para comparação com os isolados brasileiros

Núm. De acesso	Espécie	Acrônimos	Origem
KF545103	<i>Banana streak cavendish virus</i>	BSCaV	Tanzânia
JF911406	<i>Banana streak goldfinger virus</i>	BSGFV	Quênia
NC_007002	<i>Banana streak goldfinger virus</i>	BSGFV	Equador
AB252637	<i>Banana streak Mysore virus</i>	BSMyV	Indonésia
AY805074	<i>Banana streak Mysore virus</i>	BSMyV	Austrália
JF911395	<i>Banana streak Mysore virus</i>	BSMyV	Quênia
KF724855	<i>Banana streak Mysore virus</i>	BSMyV	Índia
AJ968422	<i>Banana streak obinoI'Ewai virus</i>	BSOLV	Uganda
JQ409539	<i>Banana streak obinoI'Ewai virus</i>	BSOLV	Índia
KF545102	<i>Banana streak obinoI'Ewai virus</i>	BSOLV	Quênia
KF548092	<i>Banana streak obinoI'Ewai virus</i>	BSOLV	Brasil

“Tabela 3, conclusão”

Núm. De acesso	Espécie	Acrônimos	Origem
JF911400	<i>Banana streak Uganda A virus</i>	BSUgAV	Quênia
AJ968464	<i>Banana streak Uganda C virus</i>	BSUgCV	Uganda
HQ593110	<i>Banana streak Uganda M virus</i>	BSUgMV	Uganda
HQ593108	<i>Banana streak Uganda I virus</i>	BSUgIV	Uganda
FJ439806	<i>Sugarcane bacilliform virus</i>	ScBV	Guadalupe

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

N°	Isolados	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	AM- CONQ5	99	98	98	60	59	66	99	98	99	99	99	99	68	64	64	98	98	99	98	67	67	67	67	69	64	62	65	71
2	AM- CONQ6	-	98	98	60	60	66	99	99	99	99	99	100	69	64	64	99	99	99	99	68	68	68	68	69	64	63	65	71
3	AM- CONQ7		-	97	58	58	66	98	98	98	98	98	98	68	64	64	98	98	98	98	68	68	68	68	69	64	62	65	71
4	AM- CONQ10			-	60	60	66	98	98	98	98	98	98	68	63	64	97	98	98	97	68	68	67	68	69	64	62	65	71
5	AMTAPM 15				-	99	64	60	60	60	60	60	60	64	64	63	60	60	60	60	66	66	66	66	65	78	62	57	66
6	AMTAPM 19					-	64	60	60	60	60	60	60	64	64	63	60	60	60	59	65	65	66	65	65	78	62	56	66
7	BA-JABU						-	66	66	66	66	66	66	74	64	64	66	66	66	66	97	97	97	97	69	62	65	66	65
8	BA- PAN							-	99	99	99	99	99	68	65	65	98	99	99	98	68	68	67	68	69	64	63	65	72
9	MGBRPL								-	99	99	99	99	69	64	64	99	99	99	99	68	68	68	68	69	64	63	65	71
10	MG-MYS 1									-	99	99	99	68	65	65	98	99	99	98	68	68	67	68	69	64	63	65	72
11	MG-MYS 2										-	99	99	69	64	65	98	99	99	98	68	68	68	68	69	64	63	65	71

“Tabela 4, conclusão”

N°	Isolados	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
12	MG-MYS 3											-	99	69	64	65	98	98	99	98	68	68	68	68	69	64	63	65	72
13	MG-MYS 4												-	69	64	64	99	99	99	99	68	68	68	68	69	64	63	65	71
14	KF545103													-	68	68	69	69	69	68	76	76	76	76	77	66	65	66	69
15	JF911406														-	98	64	64	64	64	65	65	65	65	65	62	64	63	66
16	NC_007002															-	64	64	65	64	65	65	65	65	65	63	64	62	66
17	AB252637																-	99	99	99	68	68	68	68	70	64	63	65	72
18	AY805074																	-	99	99	68	68	68	68	69	64	63	65	72
19	JF911395																		-	99	68	68	68	68	69	64	71	65	71
20	KF724855																			-	68	68	68	68	69	64	63	65	71
21	AJ968422																				-	100	99	100	70	64	66	67	66
22	JQ409539																					-	99	100	70	64	66	67	66
23	KF545102																						-	99	70	64	66	67	66
24	KF548092																							-	70	64	66	67	66
25	JF911400																								-	67	63	64	71
26	AJ968464																									-	63	75	65
27	HQ593110																										-	52	53
28	HQ593108																											-	100
29	FJ439806																												-

Os isolados AMTAPM15 e AMTAPM19, provenientes de banana cv. Tap Maeo do Amazonas, também apresentaram entre si identidades de nucleotídeos iguais a 99%, enquanto que o isolado BAJABU apresentou identidades inferiores 70% quando comparado com os outros 12 isolados brasileiros. A identidade de aminoácidos entre os isolados brasileiros seguiu a mesma tendência de agrupamento de isolados, com valores variando entre 58 e 100% (Tabela 5).

Quando os isolados brasileiros foram comparados com os do GenBank as identidades de nucleotídeos variaram entre 62 e 100% e as de aminoácido de 53 a 100%. Seguindo o critério de classificação do ICTV, a maioria dos isolados, ou seja, os do Amazonas, denominados de AMCONQ5, AMCONQ6 e AMCONQ10, o da Bahia (BAPAN) e os de Minas gerais (MGBRPL, MGMYS1, MGMYS2, MGMYS3 e MGMYS4) pertencem à espécie *Banana streak Mysore virus* (BSMyV), uma vez que apresentaram identidades de 97 a 99% com os isolados AB252637 da Indonésia, AY805074 da Austrália, JF911395 do Quênia e KF724855 da Índia, pertencentes a essa espécie. O isolado BAJABU ficou classificado como *Banana streak obinoi'ewai virus* (BSOLV), pois apresentou identidade de 97% com os isolados dessa espécie, o AJ968422 da Uganda, o JQ409539 da Índia, o KF545102 do Quênia e o KF548092 do Brasil. As identidades de aminoácidos do BAJABU com esses isolados foram menores do que as de nucleotídeos, ficando a menor de 93 % (KF545102) e a maior de 94% com os 3 outros isolados. Finalmente, os dois isolados AMTAPM15 e o AMTAPM19, que apresentaram uma identidade de 99% entre si, não encontraram nenhuma identidade com as espécies já aceitas pelo ICTV e depositadas no GenBank, com as quais apresentaram identidades de nucleotídeos variando entre 49 e 78%. Entretanto, apresentaram alta similaridade com as sequências endógenas encontradas por Geering et al. (2005) em *Musa acuminata* (genótipo AA). Como nesse trabalho o fragmento

genômico analisado foi obtido por RCA que amplifica apenas DNAs circulares, separando as sequências endógenas das epissomais, o fragmento detectado realmente pertence a uma partícula viral ativa, infectando a cv. Tap Maeo (genótipo AAB). Isolado semelhante detectado em Cuba, denominado E236-45 e depositada no GenBank sob número KF386729, apresentou 94% de identidade com os isolados brasileiros, indicando que esse isolado deve ocorrer também em outros países produtores de banana ao redor do mundo.

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

Nº	Isolados	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	AM-CONQ5	98	96	96	62	62	69	98	96	98	98	98	98	73	63	63	91	92	98	93	74	74	73	74	73	60	60	61	73
2	AM-CONQ6	-	98	97	64	63	70	100	98	100	100	100	100	74	65	65	93	94	100	95	75	75	75	75	75	60	61	62	75
3	AM-CONQ7		-	96	65	64	70	98	100	98	98	98	98	73	64	64	91	92	98	93	75	75	74	75	75	60	60	62	65
4	AM-CONQ10			-	62	62	68	97	96	97	97	97	97	72	63	63	91	92	97	92	73	73	73	73	74	59	59	60	73
5	AMTAPM 15				-	99	58	64	65	64	64	64	64	63	58	58	62	63	64	63	61	61	61	61	62	77	55	56	64
6	AMTAPM 19					-	58	63	64	63	63	63	63	62	57	57	62	62	63	62	61	61	61	61	61	77	55	56	63
7	BA-JABU						-	70	70	70	70	70	70	80	68	68	67	67	70	67	94	94	93	94	76	58	58	59	70
8	BA- PAN							-	98	100	100	100	100	74	65	65	93	94	100	95	75	75	75	75	75	60	61	62	75
9	MGBRPL								-	98	98	98	98	73	64	64	91	92	98	93	75	75	74	75	75	60	60	62	75
10	MG-MYS 1									-	100	100	100	74	65	65	93	94	100	95	75	75	75	75	75	60	61	62	75
11	MG-MYS 2										-	100	100	74	65	65	93	94	100	95	75	75	75	75	75	60	61	62	75
12	MG-MYS 3											-	100	74	65	65	93	94	100	95	75	75	75	75	75	60	61	62	75
13	MG-MYS 4												-	74	65	65	93	94	100	95	75	75	75	75	75	60	61	62	75
14	KF545103													-	71	71	69	69	74	70	85	85	85	85	82	59	61	61	76
15	JF911406														-	99	61	61	65	61	71	71	71	71	67	58	62	61	69
16	NC_007002															-	61	61	65	61	71	71	71	71	67	58	62	61	69

“Tabela 5, conclusão”

Nº	Isolados	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
17	AB252637																-	97	93	97	70	70	70	70	70	60	58	58	71
18	AY805074																	-	94	98	70	70	70	70	70	60	58	58	71
19	JF911395																		-	95	75	75	75	75	75	60	61	62	75
20	KF724855																			-	71	71	70	71	70	60	58	58	71
21	AJ968422																				-	100	98	100	81	60	61	62	73
22	JQ409539																					-	98	100	81	60	61	62	73
23	KF545102																						-	98	81	61	61	61	73
24	KF548092																							-	81	60	61	62	73
25	JF911400																								-	60	58	61	76
26	AJ968464																									-	55	53	59
27	HQ593110																										-	83	61
28	HQ593108																											-	65
29	FJ439806																												-

A árvore filogenética construída com base na sequência de nucleotídeos da região RT/RNaseH mostrou que os isolados brasileiros de BSV se distribuíram em dois clados principais, com o primeiro subdividido em dois subgrupos (Figura 3): o primeiro contendo os isolados da espécie BSMYSV e o segundo com a BAJABU, pertencente a espécie BSLV. Os isolados AMTAPM-15 e 19 se agruparam no segundo clado. A árvore filogenética baseada na sequência de aminoácidos apresentou grupamentos semelhantes.

Quando a sequência de nucleotídeos dos isolados do GenBank foram empregados na construção da terceira árvore filogenética, os isolados se agruparam por espécie, em 2 clados, sendo que no primeiro, subdividido em dois grupos com diversos subgrupos, os 10 Isolados brasileiros da espécie BSMYSV ficaram mais próximos ao JF911395 do Quênia. Os isolados AMTAPM15 e 19 se colocaram em um subgrupo separado, apresentando, porém, certa proximidade com a espécie BSUgCV.

O isolado JF911400, da espécie BSUgAV, proveniente do Quênia, ficou completamente isolado no segundo clado da árvore, mostrando que possui uma grande distância das demais espécies. A mesma distribuição foi observada na árvore filogenética baseada na sequência de aminoácidos, mostrando que as mutações ocorridas nos nucleotídeos dos *Badnavirus* são geralmente do tipo sinônima (Nei & Gojobori, 1986).

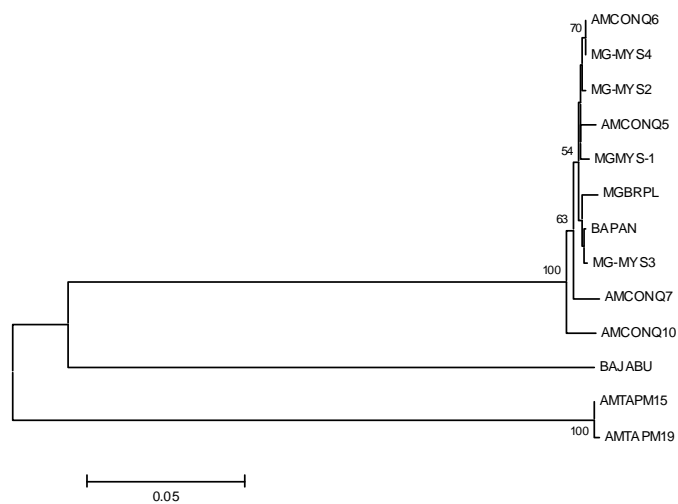


Figura 3 Árvore Filogenética construída com base na sequência de nucleotídeos da região codificadora RT/RNaseH dos isolados de *Badnavirus* estudados. Os valores foram obtidos pelo programa Mega 6.0 e teste neighbor-joining, com 2.000 repetições

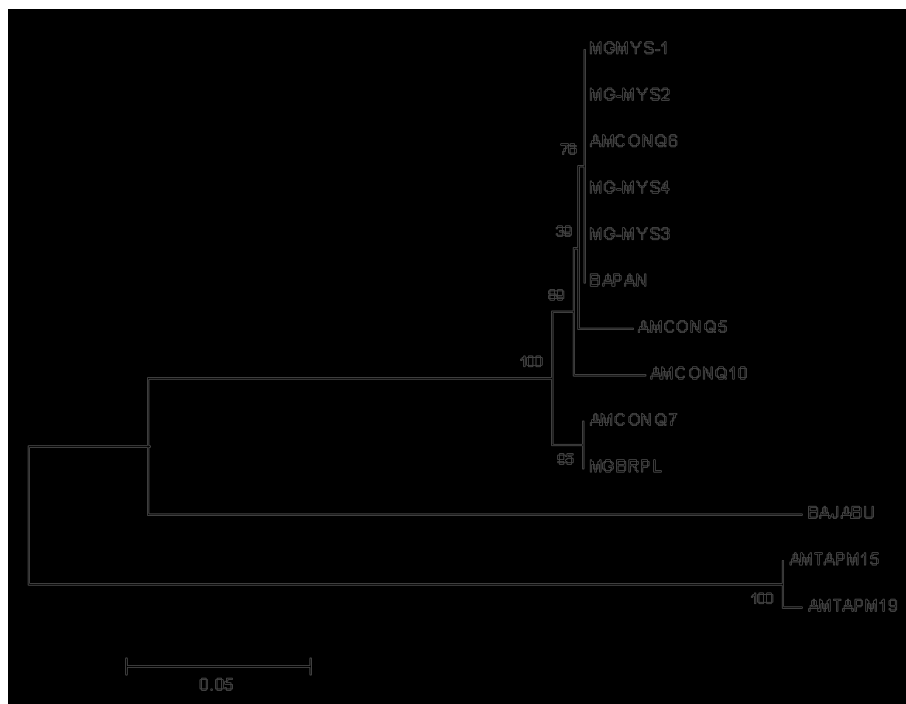


Figura 4 Árvore Filogenética construída com base na sequência de aminoácidos da região codificadora RT/RNaseH dos isolados de *Badnavirus* estudados. Os valores foram obtidos pelo programa Mega 6.0 e teste neighbor-joining, com 2.000 repetições

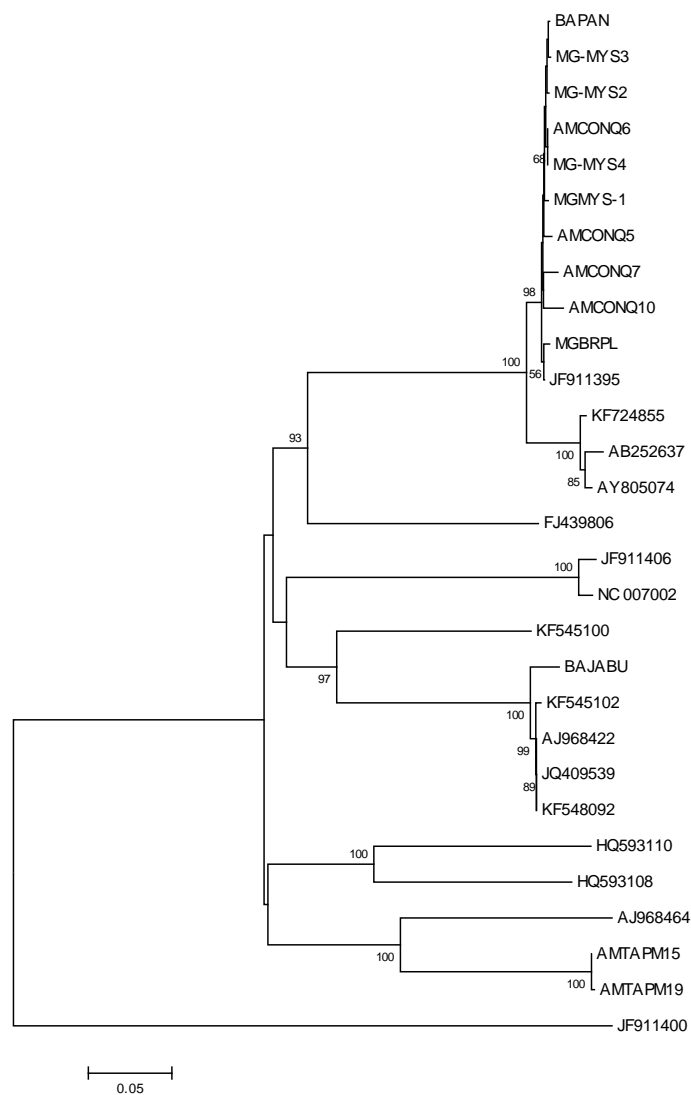


Figura 5 Árvore Filogenética construída com base na sequência de nucleotídeos da região codificadora RT/RNaseH dos isolados de *Badnavirus* estudados juntamente com os do GenBank. Os valores foram obtidos pelo programa Mega 6.0 e teste neighbor-joining, com 2.000 repetições

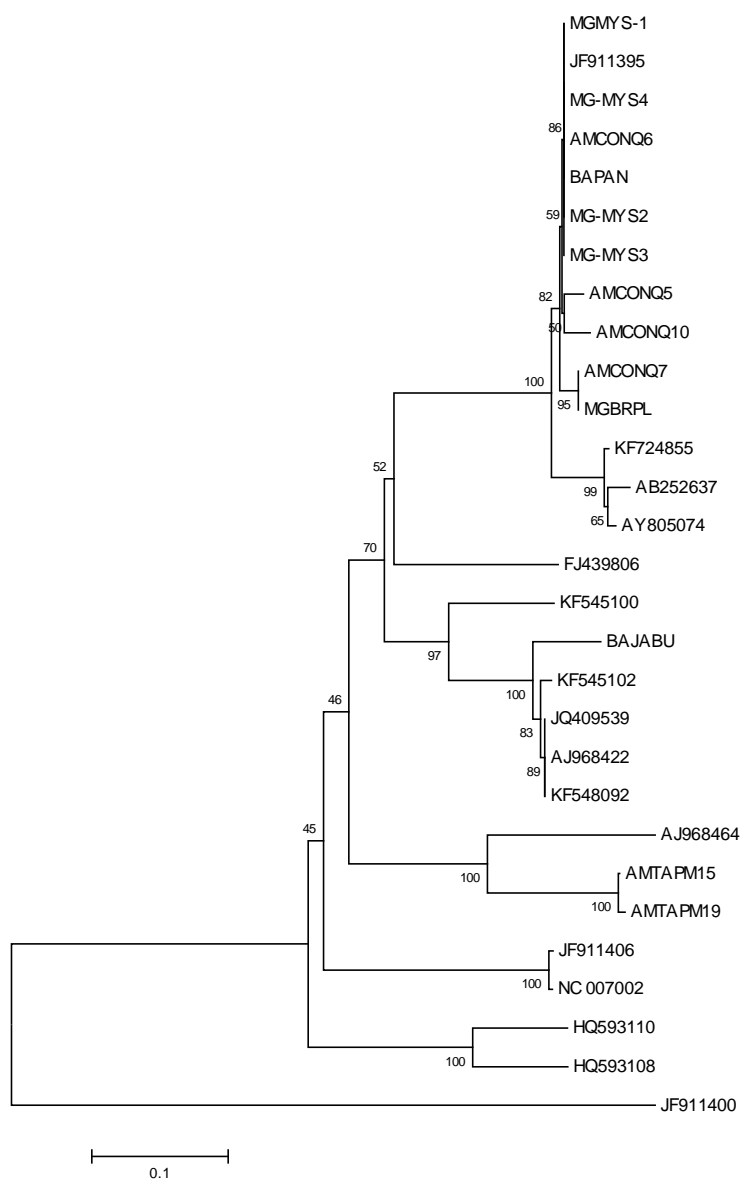


Figura 6 Árvore Filogenética construída com base na sequência de aminoácidos da região codificadora RT/RNaseH dos isolados de *Badnavirus* estudados juntamente com os do GenBank. Os valores foram obtidos pelo programa Mega 6.0 e teste neighbor-joining, com 2.000 repetições

Em diferentes estados do Brasil foram encontrados variantes genéticos de BSV, sendo denominados de BSVBR-1, BVBR-2, BSVBR-3 e BSVBR-4, porém a análise foi embasada somente no perfil eletroforético de produtos de PCR (FIGUEIREDO, 2006) e não no sequenciamento de genótipos de origem episomal, obtidos por RCA, o que pode prejudicar a interpretação dos resultados. Existe apenas um trabalho baseado na região RT/RNaseH do DNA episomal de um isolado brasileiro de *Badnavirus*, proveniente do norte do Paraná, infectando a cultivar Nanicão Jangada, pertencente à espécie *Banana streak OL virus* (CARNELOSSI et al. 2014). No presente trabalho também foram encontradas as espécies *Banana streak Mysore virus* e *Banana streak obinoi'ewai virus* (BSOLV), além de outra espécie ainda não reconhecida e detectada apenas como DNA endógeno em cultivar de bananeira com genótipo AA. A espécie *Banana streak obinoi'ewai virus* (BSOLV) apresenta uma distribuição mundial, tendo sido já reportada em diversos países como Quênia, Uganda e Índia, dentre outros (HARPER et al. 2005, JAMES et al, 2011, Khurana & Baranwal, 2014).

Uma recente detecção de BSV em Cuba mostrou a ocorrência das espécies BSOLV, BSIMV, BSGFV e BSMYV, sendo que esse último apresentou a incidência mais alta (JAVER-HIGGINSON et al. 2014). Essa ampla distribuição de espécies, tanto dentro como entre países, parece ter explicação no grande fluxo de germoplasmas e mudas para plantio que geralmente tem sido intercambiado pelos mesmos.

4.1 Resultados da restrição enzimática

Para a digestão com as enzimas EcoRI, KpnI, PstI, SacI, XbaI e XhoI, seguindo o protocolo proposto por James et al. (2011), foi escolhido um exemplar de cada uma das espécies identificadas nesse estudo com base na

análise da região RT/RNase H. Os resultados obtidos se encontram na Figura 7. Quando digeridos com a enzima KpnI, os produtos do RCA de todas as espécies apresentaram apenas uma banda com cerca de 7,5 Kb, indicando que provavelmente esses isolados não possuem o sítio de restrição reconhecido por essa enzima.

As demais enzimas geraram padrões de bandas diferentes para cada isolado, entretanto esses nem sempre foram repetitivos e não coincidiram com os padrões descritos por aquele autor para as espécies de *Badnavirus* descritas e encontradas nesse estudo. Assim sendo, a identificação de espécies de *Badnavirus* com base na restrição enzimática não parece apresentar a eficiência esperada, sendo o sequenciamento e comparação com as espécies já descritas mais seguro para a correta classificação das mesmas.

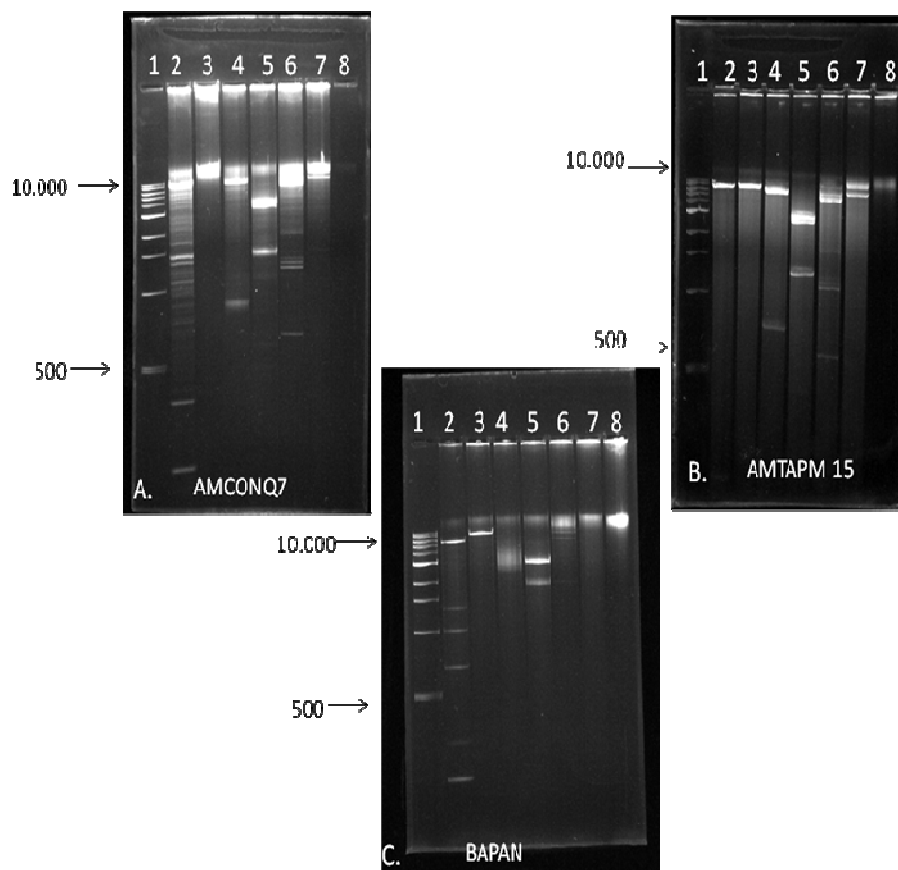


Figura 7 Análise eletroforética (A, B e C) dos produtos da restrição enzimática realizados com o genoma dos isolados AMCONQ 7, AMTAPM 15, e BAPAN

5 CONCLUSÕES

Dentre os 13 isolados brasileiros de *Badnavirus* estudados, 10 pertenciam à espécie *Banana streak Mysore virus* (BSMYSV) e um à *Banana streak OL virus* (BSOLV). Os dois restantes apresentaram identidades inferiores à 80% com todas as espécies já estudadas, devendo pertencer a uma nova espécie.

A classificação baseada na análise da região da RT/RNAse H mostrou-se mais eficiente do que a baseada no padrão de bandas da restrição enzimática do genoma viral.

REFERÊNCIAS

- ALVES, E.J. **A cultura da banana: aspectos técnicos, socioeconômicos e agroindustriais**. 2 ed. Embrapa- SPI; Cruz das Almas, Embrapa-CNPMPF, 1999, p.585.
- AGRIANUAL. Anuário da agricultura brasileira. São Paulo: FNP, Consultoria e Comércio, 2014.
- ANDRADE, F.W.R.; AMORIM, E.P.R.; ELOY, A.P.; JOSÉ, M. Ocorrência de Doenças em Bananeiras no Estado de Alagoas. **Summa Phytopathol.** v.35, n.4, p.305-309. 2009.
- BECKER, D.K.; DUGDALE, B.; SMITH, M.K.; HARDING, R.M.; DALE, J.L. Genetic transformation of Cavendish banana (*Musa* spp. AAA group) cv 'Grand Nain' via microprojectile bombardment. **Plant Cell Reports.** v.19, p.229-234. 2000.
- BRAITHWAITE, K.S.; EGESKOV, N.M.; SMITH, G.R. Detection of sugarcane bacilliform virus using the polymerase chain reaction. **Plant Disease.** v.79, p.792-796. 1995.
- BRIOSO, P. S. T.; HERRERO, C. R.; ARROYO, T.; RODRIGUES, C. M. Identificação e distribuição do vírus do mosaico do pepino em áreas de cultivo da bananeira e plátano na Costa Rica. In: XIX Congresso Brasileiro de Fitopatologia e Simpósio Latino-Americano de Virologia Vegetal, Brasília: Fitopatologia Brasileira, 1986, v. 11. p.398-399.
- BRIOSO, P.S.T.; CORDEIRO, Z.J.M.; REZENDE, J.A.M.; KITAJIMA, E.W.; PIMENTEL, J.P.; FIGUEIREDO, A.R. 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.** v.26, n.2, p.255-257. 2000.
- 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, p. 94-100. 2003.
- CHENG, C.P.; LOCKART, B.E.L. OLSEWSKI, N.E. The ORF1 and II proteins of Commelina yellow mottle virus are virion-associated. *J. Gen. Virol.* v. 223, p.263-271. 1996.

COLARICCIO, A.; CHAVES, A.L.R.; EIRAS, M.; PALAZZO, S.R.L.; MOREIRA, S.M.; MATTOS, M.A.N. Detecção do *Banana streak virus* (BSV) em mudas de meristemas de banana importadas. **Summa Phytopathologica**, v.32, p.96-97, 2006.

CÔTE, F.X.; GALZI, S.; FOLLIOT, M.; LAMAGNÉRE, Y.; TEYCHENEY, P.Y.; ISKRA-CARUANA, M.L. 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**. v.11, n.1, p. 137–144. 2010.

DAHAL, G.; GAUHL, C.P.; GAUHL, F.; THOTTAPPILLY, G.; D'AHUGHES, J. Studies on a Nigerian isolate of banana streak *Badnavirus*: 11. Effect of intraplant variation on virus accumulation and reliability of diagnosis by ELISA. **Ann. uppl. Bid.** v.132, p. 263-275. 1998.

DAHAL, G.; ORTIZ, R.; TENKOUANO, A.; HUGHES J.A.; THOTTAPPILLY, G.; VUYLSTEKE, D.; LOCKHART, B.E.L. 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**. v.49, p.68-79. 2000.

DALLOT, S.; ACUNÃ, P.; RIVERA, C.; RAMÍREZ, P.; CÔTE, F.; LOCKHART, B.E.L.; CARUANA, M.L. 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**. v.146, p. 2179–2190. 2001.

DANTAS, J.L.L.; OLIVEIRA, E.J.; PEREIRA, M.G.; CATTANEO, L.F. Melhoramento genético do mamoeiro no Brasil. In: Simpósio do papaya brasileiro, 5., 2011, Porto Seguro. Inovação e sustentabilidade: anais. Porto Seguro: Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2011.

DEAN, F.B.; NELSON, J.R.; GIESLER, T.L.; LASKEN, R.S. Rapid amplification of plasmid and phage DNA using Phi29 DNA polymerase and multiply-primed rolling circle amplification. **Genome Res.** v.11, p.1095-1099. 2001.

FARGETTE, D. et al. Molecular Ecology and Emergence of Tropical Plant Viruses. **Phytopathology**, v.44, p.235-260. 2006.

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

GAYRAL,P.; NOA-CARRAZANA, LESCOT,M.; LHEUREUX,F.; LOCKHART,B.E.L.; MATSUMOTO,T.; PIFFANELLI,P.; ISKRA-CARUANA, M.L. A Single *Banana streak vírus* Integration Event in the Banana Genome as the Origin of Infectious Endogenous Pararetrovirus. **Journal of Virology.** v.82, n.13, p.6697-6710. 2008.

GAYRAL,P.; BLONDIN,L.; GUIDOLIN,O.; CARREEL, F.; HIPPOLYTE, I.; PERRIER,X.; ISKRA-CARUANA, M.L. Evolution of endogenous sequences of *Banana streak virus*: What can we learn from banana (*Musa* sp.) evolution? **Journal of virology.** v.84, p. 7346–7359.2010.

GEERING, A.D.W.; PARRY, J.N.; THOMAS, J.E. Complete genome sequence of a novel badnavirus, banana streak IM virus. **Arch Virol.** v.156, p.733–737. 2011.

GEERING,A.D.W.;MCMICHAEL,L.A.; DIETZGEN,R.G.; THOMA,J.E. Genetic Diversity Among Banana streak virus Isolates from Australia. **Phytopathology.** v.90, n.8, p.921-927. 2000.

GEERING, A.D.W.; OLSZEWSKI, N.E.; HARPER, G.; LOCKHART, B.E.L.; HULL,R.; THOMAS, J.E. Banana contains a diverse array of endogenous badnaviruses. **Journal of General Virology.** v.86, p. 511-520. 2005.

HARPER,G.; HULL,R.Cloning and sequence analysis of banana streak virus DNA. **Virus Genes.** v.17, p.271-278.1998.

HARPER,G.; HULL, R.; LOCKHART, B.; OLSZEWSKI. Viral Sequences Integrated Into Plant Genomes. **Annu. Rev. Phytopathol.** v.40, p.119-136. 2002.

HARPER,G.;HART,D.; MOULT,S.; HULL,AR.; GEERING,A.; THOMAS,J. The diversity ofBanana streak virusisolates in Uganda. **Arch Virol.** v.150, p.2407-2420. 2005.

HULL,R.; COVEY,S.N. Retroelements: Propagation and Adaptation. **Virus Genes.** v. 11, p.105-118. 1996.

HULL,R. (2002). Plant Virology, 4th Ed. Academic Press. In Viruses of banana in East Africa. Development of a Novel Rolling - Circle Amplification Technique to Detect *Banana streak virus* that also Discriminates Between Integrated and Episomal Virus Sequence. **Plant Disease**. v.95, p.57-62. 2011.

HULL, R.; GEERING, A.; HARPER, G.; LOCKHART, B.E.; SCHOELZ, J.E. Family Caulimoviridae. In: FAUQUET, C.M.; MAYO, M.A.; MANILOFF, J.; DESSELBERGER, U.; BALL, A.L. (Ed.). Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses. San Diego: Elsevier, p.385-396. (Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses) 2005.

JAMES, A.P.; GEIJSKES,R.J.; DALE,J.L.; HARDING,R.M. Viruses of banana in East Africa. Development of a Novel Rolling - Circle Amplification Technique to Detect *Banana streak virus* that also Discriminates Between Integrated and Episomal Virus Sequence. **Plant Disease**. v.95, p.57-62. 2011a.

JAMES,A.P.; GEIJSKES,R.J.; DALE,J.L.; HARDING,R.M. Molecular characterisation of six badnavirus species associated with leaf streak disease of banana in East Africa. **Annals of Applied Biology**. v.158, p.346-353. 2011b.

JOHNEL,R.; MÜLLER,H.; RECTOR,A.; VAN RANST,M.; STEVENS,H. Rolling-circle amplification of viral DNA genomes using phi29 polymerase. **Trends in Microbiology**. v.17, n.5, p.205-211. 2009.

KOVÁCS, G.; SÁGLI,L.; JACON, G.; ARINAITWE, G.; BUSOGORO, J.P.; THIRY, E.; STROSSE, H.; SWENNEN, R.; REMY, S. Expression of a rice chitinase gene in transgenic banana ('Gros Michel', AAA genome group) confers resistance to black leaf streak disease. **Transgenic Research**. v.22, p.117-130. 2013.

LHEUREUX,F.; LABOUREAU,N.; MULLER,E.; LOCKHART,B.E.L.; ISKRA-CARUANA . Molecular characterization of banana streak acuminata Vietnam virus isolated from *Musa acuminata siamea* (banana cultivar). **Arch Virol**. v.152, p. 1409-1416.2007.

LODHI,M.A.; YE,G.N.; WEDDEN,N.F.; REISCH,B.I. A Simple and Efficient Method for DNA Extraction from Grapevine Cultivars and *Vitis* species. **Plant Molecular Biology**. v.12, n.1, p.6-13. 1994.

LOCHKART,B.E.L.; JONES,D.R. 2000. Banana Mosaic. In Viruses of banana in East Africa. Development of a Novel Rolling - Circle Amplification Technique to Detect *Banana streak virus* that also Discriminates Between Integrated and Episomal Virus Sequence. **Plant Disease**. v.95, p.57-62. 2011.

MEISSNER FILHO,P.E.; BRIOSO,P.S.T. Banana Fitossanidade. **Embrapa mandioca e fruticultura**. p.78. 2000.

NOMURA, E.S.; DAMATTO JUNIOR, E.R.; FUZITANI, E.J.; SILVA, S.O.; MORAES,W.S. Desenvolvimento e Produção da Bananeira ‘Grande Naine’ Sob Diferentes Densidades de Plantio em Região com Ocorrência Natural de Sigatoka-Negra. **Revista Brasileira de Fruticultura**. v.35, n.2, p.437-445. 2013.

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.

PALUKAITIS, P.; ROOSSINCK, M.J., DIETZGEN, R.G.; FRANCKI, R.I.B. Cucumber mosaic virus. **Adv. Virus Res.** v.41, p.281-348. 1992.

PRICE,N.S. The origin and development of banana and plantains. Edited by S.Gowen. Chapman & Hall. p.1-14.

PUA,E.C.; LEE,Y.C. Expression of a ripeningrelated cytochrome P450 cDNA in Cavendish banana (*Musa acuminata* cv. Williams). **Gene**. v.305, p.133-140. 2003.

REAGIN,M.J.; MERLA,T.L.; RESETAR-GERKE,A.L.; KAPOLKA,K.M.; MAMONE,J.A. Templphi: A sequencing template preparation procedure that eliminates overnight cultures and DNA purification. **J.Biomol.Tech**. v.14, p.143-148. 2003.

SILVA, J.R. ; CORDEIRO, Z.J.M. Fitossanidade na exportação de banana.Séries frutas do Brasil 8. **Embrapa mandioca e fruticultura**. p. 9-14. 2000.

SILVA,S.O.; AMORIM,E.P.; SANTOS-SEREJO,J.A.; FERREIRA,C.F.; RODRIGUES,M.A.D. Melhoramento Genético da Bananeira: estratégias e tecnologias disponíveis. **Rev. Bras. Frutic**. v.35, n.3, p.919-931. 2013.

SREERAMANAN, S.; MAZIAH, M.; SARIAH, S.; XAVIER, R.
Agrobacterium-Mediated Transformation of Banana Cultivar 'Rastali' (Musa,
AAB Genome) with Chitinase Gene. **Acta Hort.** v.879, p.637-648. 2010.

TAMURA, K.; DUDLEY, J.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA4: Molecular
Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. **Mol Biol
Evol.** v.24, p.1596-1599. 2007.

VARVERI, C.; BOUTSIKA, K. Characterization of cucumber mosaic
cucumovirus isolates in Greece. **Plant Pathology**, n. 48, p. 95–100. 1999.

YANG, I.C.; HAFNER, G.J.; REVILL, P.A.; DALE, J.L. HARDING, R.M. Sequence
diversity of South Pacific isolates of Taro bacilliform virus and the development
of a PCR-based diagnostic test. **Archives of Virology**. v.148, p.1957-
1968.2003.