



PATRICK CALLEGARI MAGNANI SANTOS ALVES

**DETECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO
MOLECULAR DE ISOLADOS DE *Banana streak*
vírus (BSV) NO BRASIL**

LAVRAS - MG

2013

PATRICK CALLEGARI MAGNANI SANTOS ALVES

**DETECCÃO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE ISOLADOS DE
*Banana streak vírus (BSV) 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

Profa. Dra. Antônia Figueira dos Reis

LAVRAS - MG

2013

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

Alves, Patrick Callegari Magnani Santos.

Detecção e caracterização molecular de isolados de *Banana streak virus* do Brasil / Patrick Callegari Magnani Santos Alves. –
Lavras : UFLA, 2013.

74 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2013.

Orientador: Antônia dos Reis Figueira.

Bibliografia.

1. *Streak virus* – Diagnose. 2. Fitopatologia. 3. Biotecnologia. 4.
PCR. 5. RCA. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 576.6483

PATRICK CALLEGARI MAGNANI SANTOS ALVES

**DETECCÃO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE ISOLADOS DE
*Banana streak vírus (BSV) 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 23 de agosto de 2013.

Dr. Flávio Henrique Vasconcelos de Medeiros UFLA

Dra. Suellen Bárbara Ferreira Galvino Costa UFLA

Dra. Antonia dos Reis Figueira
Orientadora

LAVRAS – MG

2013

A todos aqueles que passaram em minha vida e sensibilizaram-me com gestos, palavras ou olhares. Em especial, aos meus pais, Pio Alves da Silva Filho e Vilma Magnani Santos Alves, pelo exemplo de companheirismo, carisma, simplicidade e, principalmente, de respeito e amor à vida, nos quais eu me espelho e procuro transmitir esses valores todos os dias em que vivo.

Ao meu melhor amigo e irmão, Erick Serrat.

À minha avó, Maria Serrat “Cotinha”, e a minha madrinha, Lecy Alves (*in memoriam*), pelo vínculo sublime na minha vida. O exemplo que deixaram me ajuda a seguir, mesmo sentindo tanto sua ausência física.

Aos eternos amigos, Miguel, Beatriz, Rafaela e Osiris, por estarem sempre presentes me auxiliando, aconselhando e torcendo por mim. Vocês estarão sempre ao meu coração e na minha memória.

À minha namorada, Fabrícia Nunes, por ter compartilhado comigo momentos alegres e, também, os difíceis. E, acima de tudo, por estar sempre disposta a me fazer cada vez mais feliz.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela presença constante em minha vida.

À professora, Dra. Antonia dos Reis Figueira, pela orientação, paciência, amizade, dedicação e seus ensinamentos que foram de grande relevância para a realização deste trabalho e, também, do meu crescimento profissional. Agradeço de todo o coração!

Ao Dr. Luciano Vilela Paiva, pela amizade, companheirismo e ensinamentos.

Aos professores do Programa de Biotecnologia vegetal da UFLA, pelos ensinamentos transmitidos e harmoniosa convivência.

À Universidade Federal de Lavras (UFLA) e ao Programa de pós - graduação em Biotecnologia vegetal, bem como ao Departamento de Fitopatologia (DFP), pela oportunidade concedida para realização do mestrado.

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

Aos amigos certos das horas incertas, Erick Serrat, Marcelo Helmich, Valquíria Martins.

Aos amigos de curso por me transmitirem sabedoria, força e persistência.

Aos amigos do Laboratório Central de Biologia Molecular pela forte relação de amizade e companheirismo e por me aceitarem como membro do grupo.

Às minhas amigas e coorientadoras, Priscilla Geraldino e Suellen Costa, por serem meus exemplos de dedicação, perseverança, garra e luta estando sempre dispostas a me ajudar em todas as situações.

Aos meus amigos do laboratório de fitovirologia molecular e do centro de indexação Maurício Lucas, Nara Edreira, Anderson Sotero, Thaís Ramalho, Douglas Rodriguez, Bárbara Alves, João Almeida, Marcelo Helmich, Daniele Pompeu Luciana Godinho, Elisângela Lucas, Jaciara e Carlos Torres, “carzinho”, pelos divertidos momentos que passamos.

À Alessandra, por ajudar a manter meu lar limpo e pelas excelentes refeições que tive o privilégio de saborear toda quarta feira.

As vezes as pessoas são egocêntricas, ilógicas e insensatas.
Perdoe assim mesmo!

Se você é gentil, as pessoas podem acusá-lo de egoísta e interesseiro. Seja gentil assim mesmo!

Se você é um vencedor, terá alguns falsos amigos e alguns inimigos verdadeiros. Vença assim mesmo!

Se você é honesto e franco, as pessoas podem enganá-lo.

Seja honesto e franco assim mesmo!

O que você levou anos pra construir, alguém pode destruir de uma hora para outra. Construa assim mesmo!

Se você tem paz e é feliz, as pessoas podem sentir inveja.

Tenha paz e seja feliz assim mesmo!

O bem que você fez hoje pode ser esquecido amanhã. Faça o bem assim mesmo!

Dê ao mundo o melhor de você, mas isso nunca pode ser o bastante. Dê o melhor de você assim mesmo!

E veja que no final das contas é entre você e Deus.

Nunca foi entre você e eles!

(Madre Teresa de Calcutá)

RESUMO GERAL

O diagnóstico eficiente do *Banana streak virus* (BSV) é um grande desafio, devido a duas principais limitações: a alta diversidade desse vírus em todos os países onde ocorre, tornando ineficiente a sua detecção por testes sorológicos, pois podem gerar resultados falsos negativos e também a sua capacidade de se integrar no genoma da bananeira, de modo completo ou incompleto, o que, por sua vez, gera resultados falsos positivos quando se empregam técnicas moleculares. Esse trabalho teve como objetivo testar a eficiência da técnica denominada “*Rolling circle amplification*” (RCA), para a diagnose do BSV em bananeira sem a ocorrência de falsos positivos. Foram também coletados isolados desse vírus em diferentes regiões do país, para determinação da sua identidade em comparação com isolados já descritos em outras partes do mundo, com base na análise molecular do gene da RT/RNaseH e digestão com enzimas de restrição. Foram analisadas 41 amostras de bananeira com suspeita de infecção, provenientes de 6 estados do Brasil, e estas foram submetidas aos testes PCR e RCA. Entre as amostras positivas foram escolhidos 11 isolados para sequenciamento. Todas as amostras coletadas foram PCR positivas, entretanto, quando analisadas por RCA apenas 31 foram positivas, mostrando que, se analisadas apenas por PCR, 10 delas teriam gerado resultados falsos positivos. Os fragmentos genômicos de 540 pb, localizados no gene da RT/RNaseH, dos onze isolados sequenciados mostraram uma identidade de nucleotídeos que variou entre 65 a 99% entre eles, e de 42 a 99% com os isolados do GenBank, pertencentes às diferentes espécies já descritas, que foram empregadas para comparação. Com base nessas identidades, quatro dos isolados, foram classificados como *Banana streak uganda C virus* (BSUgCV), dois, como *Banana streak obinoI'Ewai virus* (BSOLV) e um como *Banana streak Mysore virus* (BSMyV). Três outros isolados não se classificaram em nenhuma das espécies já descritas, os denominados: PR-CAT1 e o SE-PAN1, que apresentaram identidade entre si de 92%, devendo, portanto, ser de uma mesma espécie, e o CE-PRCA1, que se mostrou completamente diferente de todos os isolados brasileiros e do GenBank. Tentativas de se empregar enzimas de restrição para caracterização das espécies não foram bem sucedidas, necessitando de pesquisas adicionais. Os dados apontam para a necessidade de se aprofundar os estudos com os agentes causais do vírus da estria da bananeira no Brasil, devido a grande variabilidade e complexidade genômica dos isolados presentes no país. Nesse trabalho foram caracterizadas pela primeira vez, com base em análises genômicas, algumas das espécies de Badnavirus que infectam a bananeira no Brasil, sendo que três novas espécies, ainda não descritas na literatura, foram aqui detectadas.

Palavras-chave: Fitopatologia. Biotecnologia. Banana streak virus.

GENERAL ABSTRACT

The efficient diagnosis of Banana streak virus (BSV) is a great challenge due to two main limitations: the high diversity of this virus in all countries where it occurs, making the detection by serological tests inefficient, since they might generate false negative results, and the capacity of integrating, complete or incompletely, into the banana genome which, in turn, generates false positive results when employing molecular techniques. This study aimed at testing the efficiency of the technique called "Rolling circle amplification" (RCA) for the diagnosis of BSV in banana without the occurrence of false positives. We also collected virus isolates in different regions of the country in order to determine their identity compared with previously described isolates from other parts of the world, based on the molecular analysis of gene RT/RNaseH and digestion with restriction enzymes. We analyzed 41 samples of banana suspected of infection, from 6 Brazilian states, submitting them to PCR and RCA tests. Among the positive samples, 11 isolates were chosen for sequencing. All collected samples were PCR positive, however, when analyzed by RCA, only 31 were positive, showing that, if analyzed only by PCR, 10 would have generated false positives. On the 540 bp genomic fragments located in the RT/RNaseH gene, eleven sequenced isolates showed an identity of nucleotides ranging from 65 to 99% among them, and 42 to 99% with the isolates from the GenBank, belonging to the different species described above, which were used for comparison. Based on these identities, four of the isolates were classified: one as *Banana streak Uganda virus C* (BSUgCV), two as *Banana streak obino/Ewai virus* (BSOLV) and one as *Banana streak Mysore virus* (BSMyV). Three other isolates were not classified in any of the described species, so-called: PR-CAT1 and SE-PAN1, which presented 92% identity with each other and, therefore, must be of the same species; and CE-PRCA1, which was shown to be completely different from the Brazilian and GenBank isolates. Attempts to use restriction enzymes in order to characterize species were unsuccessful, requiring additional research. The data point to the need for further studies with the causal agents of banana streak virus in Brazil due to the high variability and complexity of the genomic isolates present in the country. In this work, we characterized for the first time, based on genomic analyzes, some of the *Badnavirus* species which infect banana in Brazil, with three new species not yet described in the literature being detected.

Keywords: Phytopathology. Biotechnology. *Banana streak virus*.

LISTA DE FIGURAS

PRIMEIRA PARTE

- Figura 1 Organização do genoma do BSV21
- Figura 2 Mecanismo de amplificação do DNA circular pela técnica de RCA com o uso da polimerase Phi2927

SEGUNDA PARTE - ARTIGOS

ARTIGO 1

- Figura 1 Análise eletroforéticas em gel de agarose dos produtos da PCR e da RCA52
- Figura 2 Árvore filogenética construída com base na sequência de nucleotídeos dos isolados brasileiros56
- Figura 3 Árvore filogenética construída com base na sequência de aminoácidos dos isolados brasileiros57
- Figura 4 Árvore filogenética construída, considerando a sequência de nucleotídeos58
- Figura 5 Árvore filogenética construída, considerando a sequência de aminoácidos59
- Figura 6 Análise eletroforética dos produtos das restrições enzimáticas realizadas com os genomas dos 11 isolados de Badnavirus, amplificados por RCA67

LISTA DE ABREVIATURAS

Fig.	Figura
Hab.	Habitantes
Tab.	Tabela

LISTA DE SIGLAS

BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
BSV	<i>Banana streak virus</i>
BSAcVNV	<i>Banana streak acuminata Vietnam vírus</i>
BSAcYNV	<i>Banana streak acuminata Vietnam vírus</i>
BSCaV	<i>Banana streak cavendish vírus</i>
BSOLV	<i>Banana streak obinoI'ewai vírus</i>
BSMyV	<i>Banana streak mysore vírus</i>
BSGFV	<i>Banana streak gold finger vírus</i>
BSKeV	<i>Banana streak Kenia vírus</i>
BSUgV	<i>Banana streak Uganda vírus</i>
BSUgAV	<i>Banana streak Uganda A vírus</i>
BSUgCV	<i>Banana streak Uganda C vírus</i>
BSUgCIV	<i>Banana streak Uganda I vírus</i>
BSUgLV	<i>Banana streak Uganda L vírus</i>
BSUgMV	<i>Banana streak Uganda M vírus</i>
EPAGRI	Empresa De Pesquisa Agropecuária E Extensão Rural
FAO	Food Agriculture Organization
ICTV	International Committee on Taxonomy of Viruses
UFLA	Universidade Federal de Lavras
NCBI	National Center for Biotechnology Information
ORF	Open Reading Frame
PCR	Polymerase Chain Reaction
RCA	Rolling Circle Amplification
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
TA	Temperatura de anelamento

LISTA DE SÍMBOLOS

μl	Microlitros
°C	Graus centígrados
Kg	Quilograma
Kb	Quilobase
Kcal	Quilocaloria
nm	Nanômetro
Kda	QuiloDalton

SUMÁRIO

PRIMEIRA PARTE	
1	INTRODUÇÃO 15
2	REFERENCIAL TEÓRICO 18
2.1	A bananeira no Brasil e no mundo 18
2.2	<i>Banana streak vírus</i> 20
2.3	<i>Banana streak vírus</i> (BSV) no Brasil 24
2.4	Métodos de diagnose do BSV e suas limitações 25
3	CONCLUSÃO 28
	REFERÊNCIAS 29
SEGUNDA PARTE - ARTIGOS 37	
ARTIGO 1 Diagnose por PCR e RCA e caracterização molecular de isolados do <i>Banana Streak Vírus</i> coletados em diferentes regiões do país 37	
1	INTRODUÇÃO 39
2	MATERIAIS E MÉTODOS 42
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO 48
4	RESULTADO DA RESTRIÇÃO ENZIMÁTICA DOS PRODUTOS DO RCA 65
	REFERÊNCIAS 71

PRIMEIRA PARTE

1 INTRODUÇÃO

O mercado de frutas consumidas na forma “*in natura*” tem sido enriquecido cada vez mais com a crescente aceitação da banana. Essa fruta, aparece em primeiro lugar gerando o maior volume financeiro, seguido pela maçã, uva e laranja (EMPRESA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA E EXTENSÃO RURAL DE SANTA CATARINA - EPAGRI, 2011). No ano de 2012, o Brasil foi o sexto maior produtor mundial com pouco menos de 7 milhões de toneladas e área cultivada de aproximadamente 486,99 mil hectares (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS - FAO, 2012). Esse fato está diretamente relacionado com o clima nacional, que é favorável à produção de banana, propiciando a sua oferta durante todo o ano. O consumo mundial de banana per capita tem aumentado gradativamente nos últimos anos, atingindo aproximadamente 10kg/hab/ano (EPAGRI, 2011).

A crescente infecção por patógenos na cultura de banana tem onerado a maioria dos pequenos produtores, pois, além das perdas que podem variar de 6 a 90% para o *Banana Streak vírus* (BSV) (DAHAL et al., 2000; DANIELLS et al., 2001), há, também, o uso frequente de pesticidas de elevado custo. Por outro lado, considerando-se os grandes produtores, além do custo econômico, essa medida representa um custo ambiental considerável. Este quadro é, ainda, agravado pela escassez de variedades melhoradas, a dificuldade em se exterminar os vetores do BSV como as cochonilhas *Planococcus citri*, *Dysmicoccus brevipes* e *Saccharicoccus sacchari* e, também, a inexistência de medidas curativas para doenças viróticas (FRISON; SHARROCK, 1997; KUBIRIBA; LEGG; TUSHEMERIRWE, 2001; SILVEIRA et al., 2008).

Além de possuir um alto grau de variabilidade genética, o BSV possui características genéticas distintas, que o diferencia da maioria dos fitovírus conhecidos, tornando a sua detecção e controle bastante complicados. Até o momento, existem quatro espécies de BSV reconhecidas pelo órgão *International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV)*: *Banana streak obinoI'Ewai vírus (BSOLV)*, *Banana streak Gold Finger vírus (BSGFV)*, *Banana streak Mysore vírus (BSMYV)*, e o *Banana streak acuminata Vietnam vírus (BSVNV)* e outras cinco se encontram em processo de reconhecimento. Aliado a isso, por ser um membro da família *Caulimoviridae*, apresenta como peculiaridade o fato de ser capaz de se integrar ao genoma nuclear da planta hospedeira, complicando a sua detecção por métodos moleculares (GAYRAL; BLONDIN; GUIDOLIN, 2010).

As sequências virais integradas são denominadas sequências endógenas de pararetrovírus (EPRVs) e ocorrem esporadicamente (GEERING et al., 2000, 2001, 2005a; HOHN et al., 2008; JOHNE et al., 2009; JAMES et al., 2011a). Existem dois tipos de eventos de integração que têm sido encontrados em bananeiras. O primeiro tipo está contido na maioria das bananeiras e compreendem sequências incompletas do genoma viral os quais são incapazes de causar infecção. O segundo tipo de sequência integrada é conhecida como sequência endógena ativa (eaBSVs) e consiste no genoma inteiro do BSV (JAMES et al., 2011a). O primeiro tipo ocorre tanto em bananeiras com genoma A quanto em B, sendo constituído por sequências incompletas do genoma viral, chamados de EPRVs e são incapazes de causar infecção. O segundo tipo, encontrado apenas em bananeiras com genoma B, é constituído por sequências endógenas ativas (eaBSVs), contendo o genoma completo do BSV, e pode se tornar infeccioso em situações de estresse, como o hídrico, térmico e o causado pela cultura de tecidos (GAYRAL; ISKRA-CARUANA, 2009; GEERING et al., 2005a; JAMES et al., 2011a; KUNII et al., 2004). Suspeita-se que as EPRVs,

provavelmente, integram-se no genoma de seus hospedeiros por recombinações ilegítimas entre o seu DNA e o do hospedeiro. Essas inserções variam desde pequenos fragmentos a complexas sequências rearranjadas e, além disso, pode conter mais de uma cópia do genoma viral. Desse modo, é possível que plantas assintomáticas passem a apresentar sintomas, após alguns eventos de recombinação (COTÊ et al., 2010; DALLOT et al., 2001; NDOWORA et al., 1999).

Esses fatores têm tornado complicado a diagnose do BSV que é indispensável para a certificação de mudas de bananeiras. Além disso, o fato de poder ocorrer um grande número de espécies desse vírus, praticamente, inviabiliza a sua diagnose por métodos sorológicos, pelo seu alto potencial de gerar falso-negativos. A presença de EPRVs, em cultivares híbridas de banana, por outro lado, pode gerar resultados falso-positivos. Visando superar essas limitações, James et al. (2011a, 2011b) propuseram o uso de uma nova técnica denominada “rolling circle amplification” (RCA), para diferenciar as sequências tipo integrada das episomais. Essa técnica utiliza a DNA polimerase de bacteriófago Phi29, que tem sido usada para caracterizar moléculas circulares de DNA (BI; CUI; LI, 2013; DEAN et al., 2001) de diversos vírus que infectam humanos, animais e plantas (JOHNE et al., 2009; ZUNINGA; GUSTAVSSON; GYLLENSTEN, 2012).

No Brasil, a diagnose eficiente do BSV, ainda, continua sendo um grande desafio para os produtores de mudas certificadas. Nesse trabalho, pretende-se verificar a eficiência e potencial de uso da técnica RCA para a diagnose desse vírus em atividades rotineiras de diagnose, que são realizadas nos laboratórios oficiais ligados ao sistema nacional de certificação de mudas. Além disso, objetiva-se caracterizar os variantes genéticos que ocorrem nas principais regiões produtoras do Brasil, visando conhecer quais as espécies de BSV se encontram presentes nessas regiões.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 A bananeira no Brasil e no mundo

Há indícios de que a bananeira tenha sido cultivada por mais de 4000 anos e acredita-se ter originado na Ásia, mais precisamente no sudeste da China, embora existam outros centros de origem como na África oriental e em ilhas do Pacífico (MOREIRA, 1999).

A bananeira (*Musa spp.*) é cultivada na maioria dos países tropicais e sua fruta ocupa a segunda colocação entre as mais consumidas no mundo e a primeira na forma “*in natura*”, com 10,38 kg/hab/ano, superada apenas pela laranja, cujo consumo é de 12,83 kg/hab/ano (EPAGRI, 2011). O fato de poder ser produzida, durante todo ano em países tropicais, coloca a banana como um dos produtos alimentícios mais produzidos no planeta (EPAGRI, 2009). Em 2009 foram produzidas 97,4 milhões de toneladas, sendo a população da América do Sul a maior consumidora, com 21,13 kg/hab/ano, seguida pela da América Central, com 13,9 kg/hab/ano, e da Oceania, com 11,26 kg/hab/ano (EPAGRI, 2011).

A banana representa a quarta fonte de energia depois do milho, arroz e trigo (BORGES; PEREIRA; LUCENA, 2009). A sua importância na alimentação humana é em decorrência não somente de seu valor nutricional, mas também por ser um alimento altamente energético. O seu teor de carboidratos, que correspondem a, aproximadamente, 22% dos seus nutrientes, são facilmente assimilados e geram 1 kcal por grama de polpa. Possui, ainda, alto teor de potássio e vitamina C, somado a quantidades razoáveis de vitamina A, B1, B2 e elementos como fósforo, cálcio magnésio e ferro (FASOLIN et al., 2007; WALL, 2006). Isso faz com que a banana seja usada como suplementação

alimentícia, em países ou regiões mais carentes, uma vez que, além de elevado valor nutricional, é saborosa, de modo que há uma grande aceitação dessa fruta em conjunto com outros alimentos.

Cada vez mais os responsáveis pela saúde pública têm incentivado a adição de frutas e verduras ao cardápio alimentar, pois o seu consumo tem sido associado à redução de doenças e quadros isquêmicos cardiovasculares e cerebrais, além de prevenir diversos tipos de câncer (BAZZANO et al., 2002).

Alguns eventos evolutivos foram determinantes para a escolha da bananeira para o cultivo. Dentre eles destacam-se a ocorrência de partenocarpia por mutação em *Musa acuminata* e a existência de esterilidade da flor feminina que resultou no desenvolvimento dos frutos sem a ocorrência de polinização (KAEMMER et al., 1992). Evidências recentes sugerem que partenocarpia surgiu na subespécie *M. acuminata. banksii* e/ou *errans*, essas duas ocorrem em Nova Guiné e Filipinas, respectivamente (CARREEL et al., 2002). A partir disso, cultivares primitivas foram levadas pelo homem para outras partes do sudeste da Ásia, onde sofreram outros eventos de hibridização.

Os híbridos, com características comerciais relevantes, são principalmente resultantes de duas espécies, a *Musa acuminata* (genoma A) e a *Musa balbisiana* (genoma B) (HARPER et al., 2005). Essas cultivares contém combinações variadas de genomas completos das espécies parentais, e apresentam 3 níveis cromossômicos distintos: diploide, triploide e tetraploide, resultando nos seguintes grupos: AA, BB, AB, AAA, AAB, ABB, AAAA, AAAB, AABB e ABBB (ALVES, 1999).

O melhoramento genético tem sido empregado como ferramenta, para obtenção de variabilidade, que pode resultar em plantas mais produtivas, com maior valor nutritivo, adaptadas a diferentes agroecossistemas e resistentes a pragas e doenças (ALVES, 1999). O intercâmbio de material genético com outros países envolve um risco de introdução acidental de patógenos, que nem

sempre induzem sintomas visíveis. Assim sendo, é fundamental que existam testes diagnósticos eficientes, com a finalidade de evitar a introdução e disseminação dos mesmos

2.2 *Banana streak vírus*

O *Banana streak vírus* foi descrito por Lockhart (1986), em *Musa sp.*, e caracterizado posteriormente como pertencente à família *Caulimoviridae* do gênero *Badnavirus*. É um pararetrovírus, ou seja, durante o processo de replicação o 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. Possui partícula baciliforme, com 30 nm de diâmetro por 130 a 150 nm de comprimento, contendo um genoma circular, de fita dupla de DNA, com 7,4Kb, apresentando 3 ORF's. As duas ORFs menores (1 e 2) codificam duas proteínas com 20,8kDa e 14,5 kDa, respectivamente, cuja função ainda não é bem conhecida (LHEUREUX et al., 2007). A maior ORF (3) codifica uma poliproteína de 208 kDa, que é posteriormente clivada gerando as proteínas de movimento, capa proteica, aspartyl protease, transcriptase reversa e RNase H.

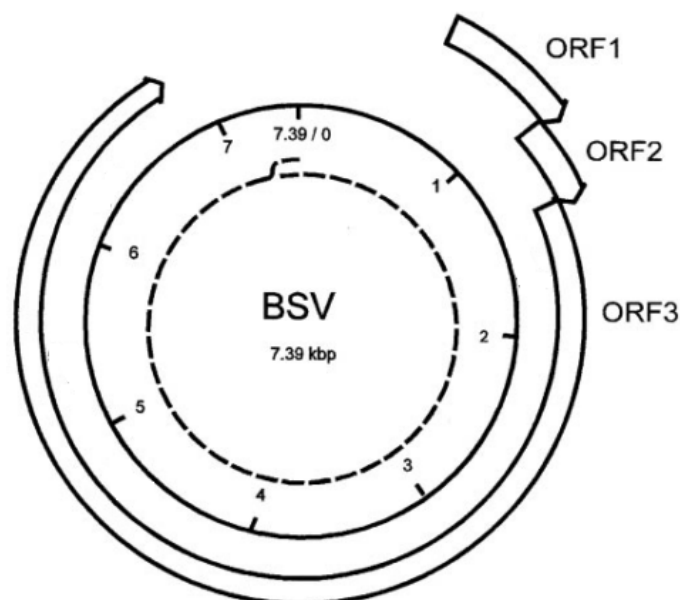


Figura 1 Organização do genoma do BSV

Nota: O círculo completo representa a dupla fita de DNA. O círculo interno pontilhado mostra o mapeamento dos transcritos. E o outro arco ilustra a posição das 3 ORF's.

Fonte: (HARPER; HULL, 1998).

O BSV é disseminado no campo de forma semi persistente pelas cochonilhas *Planococcus citri*, *Saccharicoccus sacchari* e *Dysmicoccus brevipes* (KUBIRIBA; LEGG; TUSHEMEREIRWE, 2001; SILVEIRA et al., 2008). Os sintomas, em bananeiras infectadas, iniciam-se com pequenas lesões cloróticas em forma de pontuações, que se estendem formando longas estrias cloróticas, que se tornam necróticas ficando escuras, distribuídas sobre as folhas, nem sempre afetando todas as folhas da planta. Ausência de cacho, vigor reduzido da planta e deformação do fruto, também, são observados (PEREIRA; MOREIRA; GASPAROTTO, 2003). O BSV já foi encontrado infectando plantas dos grupos genéticos de bananas em todos os níveis de ploidia e em

diversos locais ao redor do mundo, tendo todas elas mostrado alta suscetibilidade (FIGUEIREDO et al., 2006; GEERING et al., 2005b; JAMES et al., 2011b; LHEUREUX et al., 2007).

Considerando o critério estabelecido pelo ICTV para o gênero *Badnavirus*, que considera espécies distintas aquelas que possuem mais de 20% de diferença na sequência de nucleotídeos do gene que codifica a RT/RNaseH (GAYRAL; ISKRA-CARUANA, 2009; HULL et al., 2005; JAMES et al., 2011a; LOMBARDI; HARAKAVA; COLARICCIO, 2010), diversas espécies têm sido propostas. Até o presente momento as espécies de BSV já reconhecidas são: *Banana streak obinoI'Ewai virus* (BSOLV), *Banana streak goldfinger virus* (BSGFV), *Banana streak Mysore virus* (BSMYV), e *Banana streak acuminata Vietnam virus* (BSVNV), entretanto, existem mais seis que foram propostas (LHEUREUX et al., 2007; JAMES et al., 2011b).

Além da sua grande variabilidade, esse vírus possui a capacidade de integrar o seu genoma, ou parte dele, no genoma da planta hospedeira. Dois tipos de sequência integrada de BSV têm sido detectados em bananeiras. O primeiro tipo, chamado de EPRVs, contém sequências incompletas do vírus que são incapazes de causar infecção (GAYRAL; LESCOT; LHEUREUX, 2008). O segundo tipo de integração, constituído por sequências endógenas ativas do BSV (eaBSVs), contém o genoma completo do vírus inserido no genoma do hospedeiro. A maioria das EPRVs é, provavelmente, eliminada do genoma da planta, entretanto, também, pode ser integrada por meio do processo de endogenização (GAYRAL; ISKRA-CARUANA, 2009). EPRVs podem variar desde pequenos fragmentos a sequências maiores, podendo conter mais de uma cópia do genoma (GAYRAL; BLONDIN; GUIDOLIN, 2010; JAMES et al., 2011b).

O mecanismo de integração continua desconhecido. Acredita-se que as EPRVs se integram no genoma de seus hospedeiros, possivelmente, por meio de

recombinações ilegítimas entre o DNA do hospedeiro e o viral (GAYRAL; ISKRA-CARUANA, 2009). As sequências virais podem ser integradas em células germinativas de algumas plantas para se tornar parte do seu genoma, sendo, posteriormente, inseridas na população por meio de eventos como seleção natural e derivação genética (GAYRAL; BLONDIN; GUIDOLIN, 2010). Algumas espécies de BSV possuem dois segmentos de sequência viral, que juntos formam o conjunto completo do genoma do vírus e estes dois segmentos são separados por uma região de 6 kb contendo sequências virais não contíguas e invertidas. A infecção nos híbridos de bananeira acontece, a partir da ativação dessas sequências integradas, por meio de recombinações homólogas, seguidas por excisão da região de 6kb e a junção de ambas as extremidades das mesmas. Finalmente ocorre o enovelamento do ácido nucleico, dando origem a uma molécula circular em forma de mini cromossoma, que será equivalente ao vírus (NDOWORA et al., 1999).

Apesar da sua origem acidental, a presença de EPRVs tem consequências importantes para plantas hospedeiras. Essas sequências contribuem para modificação do tamanho e alterações no padrão de metilação do genoma do hospedeiro e, também, atuam como reorganizadores genômicos, por meio da indução de rearranjos cromossomais (HOHN et al., 2008), bem como elementos de transposição (BENNETZEN, 2000; KIDWELL; LISCH, 2000). Pequenas porções de EPRVs, também, foram identificadas com a função de auxiliar a planta hospedeira garantindo resistência ao vírus. Essa resistência se dá pela transcrição de RNA de interferência, silenciando partículas virais não integradas (HOHN et al., 2008). Em determinadas condições de estresse, como por exemplo, o hídrico e o ocasionado por cultura de tecidos, podem desencadear eventos de recombinação em sequências integradas resultando em infecções epissomais (CÔTE et al., 2010; JAMES et al., 2011b).

2.3 *Banana streak vírus (BSV) no Brasil*

Apesar de existirem somente duas viroses em bananeiras, registradas no Brasil, a causada pelo BSV e a causada pelo *Cucumber mosaic vírus* (CMV), ambas são considerados fatores limitantes para a produção banana no país (BRIOSO, 2003; FREIRE FILHO; BRIOSO, 2000).

Duas espécies de BSV já foram descritas como existentes no Brasil: o *Banana streak Uganda B vírus* (BSUgBV) (POLTRONIERI et al., 2008) e, também, o *Banana streak OL vírus* (LOMBARDI; HAKAKAVA; COLARICCIO, 2010). Porém, não foi levada em consideração a presença de EPRVs ou EaBSVs nem a identificação epissomal do vírus.

O Estado de São Paulo sobressai como o maior produtor de bananas do país, seguido por Bahia, Minas Gerais e Santa Catarina. A região do nordeste destaca-se como a de maior produção no território nacional com 39,5% do total (EPAGRI, 2011). A ocorrência de doenças, porém, tem sido um constante desafio para a manutenção da produtividade no Brasil e no mundo (POLTRONIERI et al., 2008). Recentemente, no Estado do Amazonas, foi relatada a ocorrência de lesões necróticas, de formato irregular, nos frutos, causadas por BSV depreciando-os completamente para a comercialização. Esse tipo de sintoma não havia sido identificado no Brasil até o momento, porém a espécie de BSV não foi determinada (BRIOSO; PEREIRA; GASPAROTO, 2011). Faz-se necessário, então, o uso de medidas que possam contribuir para o aumento do plantio de mudas sadias e, conseqüentemente, para o aumento da produção, atendendo tanto ao mercado interno quanto ao externo.

2.4 Métodos de diagnose do BSV e suas limitações

Diversos métodos têm sido descritos para a diagnose do BSV em material vegetal, como os sorológicos e os moleculares, bem como uma combinação desses. O teste sorológico mais empregado é o DAS-ELISA (*“Double Antibody Sandwich Enzyme Linked Immunossorbent Assay”*) e o teste molecular é o PCR (*“Polymerase Chain Reaction”*). Uma combinação entre esses dois, o IC-PCR (*“Immuno capture PCR”*), também, tem sido utilizado (GAYRAL; ISKRA-CARUANA, 2009; GEERING; PARRY; THOMAS, 2011; KARANJA et al., 2010).

O Teste DAS-ELISA é relativamente rápido, barato e eficiente, sendo possível a análise de diversas amostras de forma simultânea (FIGUEIREDO; BRIOSO, 2007). Entretanto, em função da grande variabilidade genética do BSV, os antissoros produzidos não são eficientes para detectar todas as espécies desse vírus, de modo que os testes baseados no uso de antissoros específicos têm se mostrado ineficientes, gerando resultados falso-negativos (FIGUEIREDO et al., 2006; GEERING et al., 2000, 2005b; HARPER et al., 2005; HARPER; HULL, 1998; LHEREUX et al., 2007).

A técnica PCR é altamente sensível e tendo sido bastante utilizada para a diagnose de fitovírus em geral. Entretanto, não é capaz de discriminar entre os EPRVs e os eaBSVs (JAMES et al., 2011a). Assim sendo, uma grande parte das bananeiras, contendo genoma B, quando analisadas por PCR, podem mostrar resultado positivo para a presença de sequências virais em seu genoma. Isso faz com que a maioria dessas plantas, mesmo aquelas portadoras apenas de EPRVs, sejam diagnosticadas como infectadas com o BSV, levando ao descarte indevido

de plantas sadias (GAYRAL; ISKRA-CARUANA, 2009; HARPER et al., 1999; JAMES et al., 2011a; LE PROVOST et al., 2006).

Uma excelente alternativa, para evitar as reações falso positivas, seria o uso do IC-PCR, pois nessa técnica, primeiramente, faz-se a captura da partícula viral com antissoro específico para depois partir para a PCR, o que impediria a detecção dos EPRVs (HARPER et al., 1999). Entretanto, em virtude da variabilidade genética do BSV, a mesma limitação observada para o teste ELISA faz com que essa técnica seja ineficiente, por gerar resultados falso-negativos (HARPER et al., 2002; JAMES et al., 2011b).

O uso de uma técnica alternativa para contornar esses problemas na diagnose do BSV foi proposto por James et al. (2011a, 2011b), denominada de “*rolling circle amplification*” (RCA). Essa técnica é elaborada com a polimerase do bacteriófago Phi29 que se caracteriza por possuir alta fidelidade e capacidade de deslocamento, além de elevada processabilidade. Durante a reação de RCA primers randômicos se ligam ao DNA e a polimerase se liga à extremidade 3'dos mesmos, iniciando, assim, 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 DNA recém sintetizado pode, então, ser alvo de outros primers, onde outras polimerases podem iniciar novos processos de amplificação (fig.2). O RCA tem sido usado para a amplificação e caracterização de moléculas circulares de DNA incluindo plasmídeos. Portanto, quando empregada com o DNA total da planta, ela amplifica apenas o DNA circular do vírus, evitando os falso-positivos decorrentes da detecção dos EPRVs, como ocorre com o PCR normal. Utilizando-se um conjunto de primers, capazes de detectar a maioria das espécies de BSV, essa técnica tem um grande potencial para ser empregada com sucesso na sua diagnose, além de diferenciar entre sequência epissomal e integrada (JAMES et al., 2011a, 2011b).

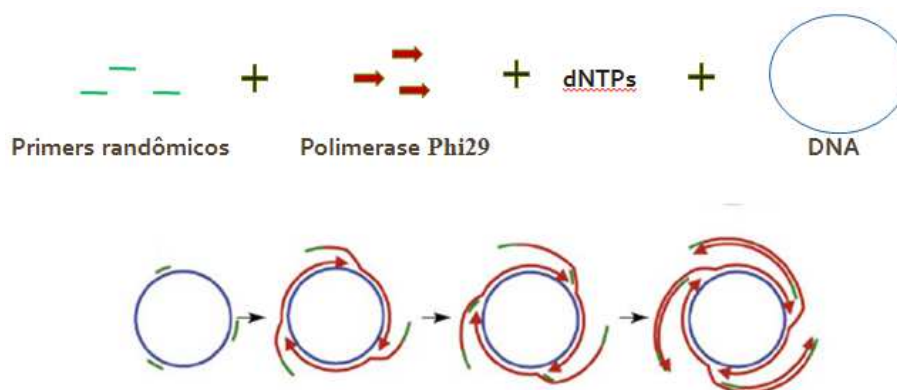


Figura 2 Mecanismo de amplificação do DNA circular pela técnica de RCA com o uso da polimerase Phi29

Nota: Os primers juntamente com o DNA viral e dNTPs são submetidos à temperatura de 95°C, posteriormente, a mistura é resfriada para que seja adicionada à polimerase. O processo completo da reação dura 18 horas sob temperatura de 30°C.

Fonte: (JOHNE et al., 2009).

3 CONCLUSÃO

A escolha das técnicas a serem usadas e o conhecimento do produto final amplificado é primordial para a diagnose segura do vírus. Isso em razão do fato do vírus do BSV possuir como característica a possibilidade da inclusão do seu genoma completo no genoma do hospedeiro podendo ser ativado de acordo com as condições ambientais. Sendo assim, na PCR convencional, faz-se necessário o uso de primers que flanqueiem o genoma completo do vírus e, sendo esse identificado, é recomendado que a muda seja diagnosticada positiva

A técnica mais eficiente para a diagnose do BSV é o RCA, uma vez que, com ela, é possível analisar somente o genoma viral circular presente na planta. As modificações na técnica proposta por James et al. (2011a, 2011b) podem auxiliar a evidenciar ainda mais o resultado.

Visando à comercialização segura de bananeira e a diminuição na ocorrência desse vírus na cultura, sugere-se o uso dessas duas metodologias e o descarte das mudas contaminadas para aquelas que forem diagnosticadas como positiva.

REFERÊNCIAS

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

BAZZANO, L. A. et al. Fruit and vegetable intake and risk of cardiovascular disease in US adults: the first National Health and Nutrition Examination Survey Epidemiologic follow-up study. **American Journal of Clinical Nutrition**, New York, v. 76, n. 1, p. 93-99, July 2002.

BENNETZEN, J. L. Transposable element contributions to plant gene and genome evolution. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 42, n. 1, p. 251-269, Jan. 2000.

BI, S.; CUI, Y.; LI, L. Ultrasensitive detection of mRNA extracted from cancerous cells achieved by DNA rotaxane based cross rolling circle amplification. **Analyst**, London, v. 138, n. 1, p. 197-203, Jan. 2013.

BORGES, A. M.; PEREIRA, J.; LUCENA, E. M. P. Caracterização da farinha de banana verde. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 29, n. 2, abr./jun. 2009. Disponível em:
<http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0101-20612009000200015>. Acesso em: 10 mar. 2013.

BRIOSO, P. S. T. Detecção e controle dos vírus das estrias e do mosaico da bananeira. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO SOBRE BANANICULTURA, 1., 2003, Paracatu. **Anais...** Cruz das Almas: Nova Civilização, 2003. p. 94-100.

BRIOSO, P. S. T.; PEREIRA, J. C. R.; GASPAROTO, A. 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.

CARREEL, F. et al. Ascertaining maternal and paternal lineage within Musa by chloroplast and mitochondrial DNA RFLP analyses. **Genome**, Ottawa, v. 45, n. 4, p. 679-692, Aug. 2002.

CÔTE, 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.

DAHAL, 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. 2000.

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. B. 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 Phi29 DNA polymerase and multiply-primed rolling circle amplification. **Genome Research**, Cold Spring Harbor, v. 11, n. 6, p. 1095-1099, June 2001.

EMPRESA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA E EXTENSÃO RURAL DE SANTA CATARINA. **Síntese anual da agricultura de Santa Catarina: 2008-2009**. Florianópolis: EPAGRI/CEPA, 2009. Disponível em: <<http://www.epagri.sc.gov.br>>. Acesso em: 5 ago. 2012.

EMPRESA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA E EXTENSÃO RURAL DE SANTA CATARINA. Centro de Socioeconomia e Planejamento Agrícola. **Síntese anual da agricultura de Santa Catarina: 2011-2012**. Florianópolis, 2011. Disponível em: <<http://www.bb.com.br/docs/pub/inst/dwn/Vol3FruticBanana.pdf>>. Acesso em: 27 set. 2012.

FASOLIN, L. H. et al. Biscoitos produzidos com farinha de banana: avaliações química, física e sensorial. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 27, n. 3, p. 524-529, jul. 2007.

FIGUEIREDO, D. et al. Detecção e análise da variabilidade de sequências do banana streak virus (BSV) em bananeiras no Brasil. **Summa Phytopathology**, Jaguariúna, v. 10, p. 118-123, 2006.

FIGUEIREDO, D. V.; BRIOSO, P. S. T. PCR multiplex para a detecção de BSV e CMV em bananeiras micropropagadas. **Summa Phytopathology**, Jaguariúna, v. 33, n. 2, p. 118-123, set. 2007.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **Final 2011 data and preliminar 2012 data for 5 major commodity aggregates now available**. Rome, 2012. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>>. Acesso em: 21 jun. 2013.

FREIRE FILHO, M. P.; BRIOSO, P. S. T. Frutas do Brasil. In: _____. **Banana fitossanidade: doenças causadas por vírus**. Brasília: EMBRAPA, 2000. p. 78-81.

FRISON, E. A.; SHARROCK, S. L. Banana streak virus: a unique virus-Musa interaction? In: _____. **Proceedings of a workshop of the PROMUSA: virology working group**. Paris: Promusa, 1997. p. 7-70.

GAYRAL, P.; BLONDIN, L.; GUIDOLIN, O. 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.; 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.

GAYRAL, P.; LESCOT, M.; LHEUREUX, F. A single banana streak virus integration event in the banana genome as the origin of infectious endogenous pararetrovirus. **Journal of Virology**, New York, v. 82, n. 13, p. 6697-6710, July 2008.

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. Banana contains a diverse array of endogenous badnaviruses. **Journal of General Virology**, London, v. 86, p. 511-520, Jan. 2005a.

GEERING, A. D. W. 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. 150, n. 4, p. 787-796, Apr. 2005b.

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.

GEERING, A. D. W.; PARRY, J. N.; THOMAS, J. E. Complete genome sequence of a novel badnavirus, banana streak IM virus. **Archives of Virology**, New York, v. 156, n. 4, p. 733-737, Apr. 2011.

HARPER, B. 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. 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, n. 2, p. 207-213, Mar. 1999.

HARPER, G.; HULL, R. Cloning and sequence analysis of banana streak virus DNA. **Virus Genes**, Norwell, v. 17, n. 3, p. 271-278, Nov. 1998.

HOHN, T. et al. Evolution of integrated plant viruses. In: ROOSSINCK, M. (Ed.). **Plant virus evolution**. Heidelberg: Springer, 2008. p. 53-58.

HULL, R. et al. Family Caulimoviridae. In: FAUQUET, C. M. et al. (Ed.). **Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses**. San Diego: Elsevier, 2005. p. 385-396.

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

JAMES, A. P. et al. Molecular characterization of six badnavirus species associated with leaf streak disease of banana in East Africa. **Annals of Applied Biology**, Warwick, v. 158, p. 346-353, 2011b.

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.

KAEMMER, D. et al. Oligonucleotide and amplification fingerprinting of wild species and cultivars of banana (*Musa* spp.). **Bio/Technology**, New York, v. 10, n. 9, p. 1030-1035, Sept. 1992.

KARANJA, L. et al. Establishment of virus-free banana (*Musa* spp.) mother stock for production of certified banana plants and banana streak virus tested. **Acta Horticulturae**, The Hague, v. 879, n. 2, p. 661-668, 2010.

KIDWELL, M. G.; LISCH, D. R. Transposable elements and host genome evolution. **Trends in Ecology and Evolution**, Amsterdam, v. 15, n. 3, p. 95-99, Mar. 2000.

KUBIRIBA, J.; LEGG, J. P.; TUSHEMEREIRWE, W. E. ADIPALA disease spread patterns of banana streak virus in farmers' fields in Uganda. **Annals of Applied Biology**, Warwick, v. 139, n. 1, p. 31-36, 2001.

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

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.

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

LOCKHART, B. E. L. Purification and serology of a baciliform virus associated with banana streak disease. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 76, n. 10, p. 995-999, May 1986.

LOMBARDI, R.; HARAKAVA, R.; COLARICCIO, A. Clonagem e purificação de fragmento da proteína capsidial de Banana streak OL virus. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 45, n. 8, p. 811-817, ago. 2010.

MOREIRA, R. S. **Banana: teoria e prática de cultivo**. 2. ed. Campinas: Fundação Cargill, 1999. 1 CD-ROM.

NDOWORA, T. et al. Evidence that badnavirus infection in *Musa* can originate from integrated pararetroviral sequences. **Virology**, London, v. 255, n. 2, p. 214-220, Mar. 1999.

PEREIRA, J. C. R.; MOREIRA, A.; GASPAROTTO, L. Estado nutricional de bananeiras infectadas por estirpes de Banana streak virus no Amazonas. **Fitopatologia Brasileira**, Fortaleza, v. 28, p. S394-S394, 2003. Suplemento.

POLTRONIEIR, L. S. et al. Constatação do banana streak Uganda B virus em bananeiras no Estado do Pará. **Summa Phytopathology**, Botucatu, v. 35, n. 1, p. 74-76, jan./fev. 2009.

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

WALL, M. Ascorbic acid, vitamin A, and mineral composition of banana (*Musa* sp.) and papaya (*Carica papaya*) cultivars grown in Hawaii. **Journal of Food Compositions and Analysis**, New York, v. 19, n. 5, p. 434-445, Aug. 2006.

ZUNINGA, Y.; GUSTAVSSON, I.; GYLLENSTEN, U. Multiply-primed rolling circle amplification of human papillomavirus using sequence-specific primers. **Virology**, London, v. 432, n. 1, p. 57-62, Oct. 2012.

SEGUNDA PARTE - ARTIGOS

ARTIGO 1 Diagnose por PCR e RCA e caracterização molecular de isolados do *Banana Streak Vírus* coletados em diferentes regiões do país

Patrick C. M. S. Alves *

Antonia dos Reis Figueira *

Priscilla S. Geraldino-Duarte *

Suellen B. F. Galvino-Costa *

Normalizado de acordo com a NBR 6022 (ABNT, 2003).

* UNIVERSIDADE FEDERAL DE LAVRAS, Departamento De Fitopatologia, UFLA, 37200-000, Lavras, MG, Brasil.

RESUMO

Este estudo confirma a eficiência da técnica “*Rolling circle amplification*” (RCA) para o diagnóstico do *Banana streak virus* (BSV), sem a ocorrência de falsos positivos, que significa um desafio a ser vencido pelos produtores de mudas e por centros de indexação. 41 amostras de banana com suspeita de infecção por vírus, foram recolhidas em quatro das cinco regiões do Brasil, para determinar a sua identidade em comparação com isolados descritos em outras partes do mundo, com base na análise molecular do gene de RT/RNaseH. Estas amostras foram analisadas e submetidas a testes de PCR e RCA. Todas as amostras foram positivas no teste de PCR, no entanto, quando analisadas por RCA apenas 31 eram positivas, indicando que, se fossem feitas apenas análises por PCR, 10 deles teriam resultado falso positivo. Entre as amostras positivas, nos dois testes, 11 isolados foram escolhidos para sequenciamento e análise. A sequência correspondente a região codificadora de proteína RT/RNaseH, a partir dos onze isolados sequenciados, revelou uma identidade de nucleótidos que variou de 65 a 99% entre si, e de 42-99% com os isolados do GenBank pertencentes a diferentes espécies. A identidade de aminoácidos variou de 36 para 96% entre os isolados brasileiros e de 22 a 100% com os isolados do vírus do GenBank. Com base nessas identidades, quatro isolados, denominados MG-GRN, BA-M53, MG-PA2 e AM-TAPM1 foram classificados como *Banana streak Uganda virus C* (BSUgCV), dois denominados BA-CA11 e MG-MA1 foram considerados *Banana streak ObinoI'Ewai virus* (BSOLV) e *Banana streak Mysore virus* (BSMyV), respectivamente. A estirpe MG-PHIA, apesar de ter de identidade de aminoácidos de 80% com a espécie BSOLV, mostrou uma identidade de nucleótidos abaixo deste valor mínimo não podendo ser considerada desta espécie. Três outros isolados não foram classificados em qualquer uma das espécies já descritas: o PR-CAT1 e SE-PAN1, que apresentaram identidade de 92% entre si, e portanto são da mesma espécie, e CE-PRCA1, que se mostrou completamente diferente dos isolados do Brasil e dos isolados do GenBank. Tentativas de se empregar enzimas de restrição para caracterização das espécies não foram bem sucedidas, necessitando de pesquisas adicionais. Os dados apontam para a necessidade de se

aprofundar os estudos com os agentes causais do streak da bananeira no Brasil, devido a grande variabilidade e complexidade genômica dos isolados presentes no país. Nesse trabalho foram caracterizadas pela primeira vez, com base em análises genômicas, algumas das espécies de Badnavirus que infectam a bananeira no Brasil, sendo que três novas espécies, ainda não descritas na literatura, foram aqui detectadas.

Palavras-chave: Fitopatologia. Biotecnologia. *Banana streak vírus*.

1 INTRODUÇÃO

O *Banana streak vírus* (BSV) é considerado, atualmente, um dos principais vírus de bananeira, sendo um problema que afeta a produção de bananas tanto no Brasil como em outras partes do mundo onde a banana é cultivada (FIGUEIREDO et al., 2006; JAMES et al., 2011a). O BSV pertence à família *Caulimoviridae*, gênero *Badnavirus* com as seguintes espécies: *Banana streak obino'ewai vírus* (BSOLV), *Banana streak goldfinger vírus* (BSGFV), *Banana streak mysore vírus* (BSMYV), e *Banana streak acuminata vietnam vírus* (BSVNV). Entretanto, outros variantes análogos já foram descritos: *Banana streak imove vírus* (BSIMV), *Banana streak cavendish vírus* (BSCAV), *Banana streak uganda vírus* (BSUgV), *Banana streak kenya vírus* (BSKeV), *Banana streak acuminata yunnan vírus* (BSYNV)

O BSV tem a capacidade de inserir o seu genoma, ou parte dele, no genoma da planta hospedeira e dois tipos de sequência integrada de BSV têm sido detectados em bananeiras. O primeiro tipo, chamado de sequência endógena de pararetrovírus (EPRVs), contém sequências incompletas do vírus que são incapazes de causar infecção (GAYRAL et

al., 2008; JAMES et al., 2011a). O segundo tipo de integração, constituído por sequências endógenas ativas do BSV (eaBSVs), contém o genoma completo do vírus inserido no genoma do hospedeiro (JAMES et al., 2011a) e podem ser ativadas sob condições de estresse, infectando-o sistemicamente. A maioria das EPRVs é, provavelmente, eliminada do genoma da planta mas, assim como eaBSVs, pode ser integrada por meio do processo de endogenização (GAYRAL; BLONDIN; GUIDOLIN, 2010). EPRVs podem variar desde pequenos fragmentos a sequências maiores, podendo conter mais de uma cópia do genoma (JAMES et al., 2011a).

Essa variabilidade, aliada à capacidade de integração ao genoma do hospedeiro, faz com que a diagnose do BSV seja um grande desafio para os produtores de mudas e para os agricultores, pois produzir e propagar mudas sadias constituem uma das medidas mais importantes de controle para esse vírus, pois, em virtude da natureza da interação patógeno-hospedeiro, uma vez infectada a planta não pode ser recuperada. A sua variabilidade faz com que a diagnose do BSV por DAS-ELISA ou mesmo IC-PCR seja ineficiente, pela possibilidade de gerar falsos negativos, enquanto que a diagnose por PCR pode gerar falsos positivos, por ser capaz de detectar tanto as sequências ativas como as que são, potencialmente, incapazes de gerar uma infecção, quando estas se encontram integradas ao genoma da hospedeira (FIGUEIREDO et al., 2006; GEERING et al., 2000, 2005b; HARPER et al., 2005; HARPER; HULL, 1998; JAMES et al., 2011a; LHEREUX et al., 2007).

Em uma tentativa de melhorar a eficiência dos métodos de diagnose do BSV, James et al. (2011a, 2011b) adaptaram a técnica

denominada de rolling circle amplification (RCA), já empregada por outros autores para amplificar DNAs circulares, incluindo plasmídeos (DEAN et al., 2001; REAGIN et al., 2003) e diversos vírus que infectam humanos e animais (JOHNE et al., 2009). Utilizando essa técnica, aliada à restrição enzimática, James et al. (2011a, 2011b) foram capazes de separar e identificar as espécies de BSV que ocorrem na Uganda e Quênia.

Até o momento não se conhece quais são as espécies de *Badnavirus*, análogas ao BSV, que ocorrem no Brasil. Algumas espécies como a *Banana streak Uganda B vírus* (BSUgBV) (BRIOSO; PEREIRA; GASPAROTO, 2011; POLTRONIERI et al., 2009) e o *Banana streak OL vírus* (BSOLV) (LOMBARDI; HARAKAVA; COLARICCIO, 2010) foram descritas, considerando apenas no tamanho dos fragmentos amplificados com os primers degenerados (BRIOSO; PEREIRA; GASPAROTO, 2011; FIGUEIREDO et al., 2006). Quatro outros variantes genéticos denominados de BRSV-BR1, BRSV-BR2, BRSV-BR3 e BRSV-BR4 foram descritos por Figueiredo e Briosos (2007) e Figueiredo et al. (2006). Entretanto, para que essas estirpes brasileiras sejam caracterizadas, existe a necessidade de se fazer o sequenciamento genético e determinar o padrão de bandas do DNA viral, quando digerido com enzimas de restrição, para compará-los com os resultados já obtidos por outros autores e determinar as identidades com as espécies já descritas (GAYRAL et al., 2008; GAYRAL; ISKRA-CARUANA, 2009; GEERING et al., 2000, 2001, 2005a; HARPER et al., 2005; JAMES et al., 2011a, 2011b), o que permitirá constatar se realmente estas são

espécies ou estirpes distintas das já conhecidas em outros países onde esse vírus ocorre.

O presente trabalho foi realizado com o objetivo de testar a técnica RCA para diagnose do BSV e caracterizar os variantes genéticos coletados em regiões produtoras do Brasil, buscando conhecer quais as espécies de BSV se encontram presentes nessas regiões, por meio do sequenciamento genético da região codificadora da RT/RNaseH e da restrição enzimática dos produtos do RCA.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

Coleta Das Amostras

Foram coletadas 41 amostras de bananeira com suspeita de infecção com o BSV em diferentes pólos de produção e de pesquisa, localizados em distintas regiões do país, com a colaboração de pesquisadores e técnicos ligados a Instituições de Ensino e Pesquisa e/ou a laboratórios de produção de mudas por cultura de tecidos. No momento do recebimento das amostras, parte do tecido recebido foi submetido à extração do DNA e o restante do material foi acondicionado em freezer - 80°C e dessecadas para possíveis repetições. Como controles negativos foram utilizadas amostras de bananeiras mantidas na casa de vegetação da UFPA, comprovadamente livre dos vírus.

Extração do ácido nucleico

Amostras de folhas desidratadas (0,015g) ou frescas (0,15g), de plantas infectadas e sadias, foram trituradas em almofariz na presença de nitrogênio líquido com o uso de pistilo. Em seguida foram adicionados 1,5 ml de tampão de extração (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) e o extrato obtido foi transferido para tubos Eppendorf de 1,5ml. Logo após, foi adicionado o mesmo volume do extrato de clorofórmio/álcool isoamílico (na proporção de 24:1), a mistura foi centrifugada a 11.000 x g por 10 minutos. O sobrenadante foi misturado com mesmo volume de isopropanol e incubado à temperatura de -20°C por 1 hora. Após nova centrifugação, o sobrenadante foi descartado, o pellet lavado com etanol a 70%, secado e ressuspenso em 100µl de tampão TE. Esse DNA foi, então, armazenado a -20 °C para ser utilizado nos experimentos posteriores (LODHI et al., 1994).

PCR

O DNA, proveniente das plantas com suspeita de infecção, foi amplificado por PCR, utilizando-se os primers específicos para diagnose, já descritos na literatura e/ou desenhados para esse trabalho, para amplificar o ácido nucleico tanto das espécies reconhecidas pelo ICTV: *Banana streak mysore vírus* (BSMyV), *Banana streak obino l'ewai vírus* (BSOLV), *Banana streak gold finger vírus* (BSGFV) e *Banana streak acuminata vietnam vírus* (BSVNV) (GEERING; PARRY; THOMAS, 2011; KARANJA et al., 2010) como também as não reconhecidas por esse órgão como : *Banana streak uganda vírus* (BSUgV) e *Banana streak kenia vírus* (BSKeV). Apesar de terem sido utilizados cerca de 15 pares

de primers (dados não mostrados) estão aqui discriminados apenas aqueles que foram mais eficientes na detecção do BSV (Tabela 1).

Para uma reação com volume de 50 µl foram empregados: 10µl de tampão 5x Green GoTaq Flexi, 2 µl de MgCl₂ [25mM], 1,5 µl de primer [10 µM], 2 µl de dNTP [10 µM], 1 µl de DNA, 0,25 µl de enzima GoTaq Flexi Polimerase e água ultrapura para completar o volume total da reação. O ciclo de amplificação empregado foi: desnaturação inicial a 94 °C por 2 minutos, seguidos por 35 ciclos de 94 °C por 20 segundos, de 50 °C a 60 °C por 20 segundos e 72 °C por 30 a 60 segundos, com uma extensão final de 72 °C por 2 a 5 minutos. O produto da reação foi analisado em gel de agarose 1%, contrastado com GelRedTM (Biotium Corp.) e observado no fotodocumentador.

Tabela 1 Primers empregados para a amplificação de fragmentos genômicos do *Banana streak vírus* (BSV) pelas técnicas de PCR e RCA

Primer	Sequência (5' - 3')	Referência
1A	CTNTAYGARTGGYTNGTNATGCCNTTYGG	Harper et al. (2002)
4'	TCCAYTTRCANAYNSCNCCCCANCC	Harper et al. (2002)
BadnaFP	ATGCCITTYGGIITIAARAAYGCICC	Yang et al. (2003)
BadnaRP	CCAYTTRCAIACISCICCCCAICC	Yang et al. (2003)
BSV2292	ATGARYTAHATWAGRTGYTMSCC	James et al. (2011a)
BSV2826	TYYWGAAARCATGGTGGGRGARGA	James et al. (2011a)
BSV3298	YTCCCAICTTTCRAAKACYTT	James et al. (2011a)
BSV3517	KRATMTTYTWTYTDGAARATCC	James et al. (2011a)
BSV3700	KTGGBAGTTTKGTRAAGARYTC	James et al. (2011a)
BSV4030	TGCARRTGYTWYGCYTGYYGAGA	James et al. (2011a)
BSV6652	GAAAARRTMTGYGCNTAYGCVAG	James et al. (2011a)

Rolling Circle Amplification

Após a confirmação da amplificação do DNA pela PCR convencional, o DNA extraído foi submetido ao RCA, usando o kit “Illustra TempliPhi 100 Amplification” (GE Healthcare, Buckinghamshire, United Kingdom), seguindo as recomendações do fabricante com as modificações propostas por James et al. (2011a). A 1 µl do ácido nucleico extraído foram adicionados 5 µl de solução tampão e 1 µl de uma mistura, contendo 11 primers, com concentração de 4,16 pmol/µl cada (Tab. 2). Em seguida o DNA foi desnaturado a 95°C por 3 minutos e adicionaram-se 5 µl da solução de reação do kit, preparado, previamente, com 0,2 µl de Ø 29 DNA polimerase. A reação foi incubada a 30°C por 18 horas, em estufa e, posteriormente, a 65°C por 10 minutos em banho Maria. O produto obtido foi analisado em gel de agarose a 1%, contrastado com GelRed™ e observado no fotodocumentador.

Sequenciamento e análise das Sequências

Diferentes isolados de cada região foram escolhidos para serem sequenciados, considerando os resultados da digestão com as enzimas de restrição. Foi feita uma amplificação por PCR empregando os primers BadnaFP e BadnaRP (YANG et al., 2003) e a banda obtida, com cerca 580pb foi purificada usando o produto Wizard® Genomic DNA Purification, seguindo o protocolo da empresa Promega.

O sequenciamento foi elaborado pela empresa Genewiz (South Plainfield, New Jersey, USA) e a análise da sequência foi realizada

utilizando o programa BioEdit (ver. 7.0.90), NCBI BLAST (NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION - NCBI, 2013a), e a identificação das regiões de codificação foi realizada com a leitura do programa Open Frame Finder (ORF Finder) fornecida pelo NCBI (2013b). O alinhamento de sequências de nucleotídeos foi realizado utilizando o programa CLUSTAL W2 (ver. 2.0).

A identidade dos fragmentos dos clones foi determinada pela comparação entre as sequências publicadas no banco de dados do NCBI usando a ferramenta de alinhamento ClustalW2 (tab. 2). Em razão da inexistência de sequências de clones brasileiros no GenBank, não foi possível, nesse teste, a realização de uma análise comparativa entre os estudos realizados no Brasil.

Tabela 2 Número de acesso das espécies de BSV np NCBI com a respectiva espécie e os isolados pesquisados

Núm. De acesso	Espécie	Acrônimos	Origem
	<i>Banana streak Acuminata Yunnan</i>		China
DQ092436	<i>vírus</i>	BSYnV	
	<i>Banana streak Acuminata Vietnam</i>		Vietnã
AY750155	<i>vírus</i>	BSVnV	
EU908859	<i>Banana streak cavendish vírus</i>	BSCaV	Guadalupe
NC_015506	<i>Banana streak cavendish vírus</i>	BSCaV	Quênia
HQ593111	<i>Banana streak cavendish vírus</i>	BSCaV	Quênia
NC_007002	<i>Banana streak goldfinger vírus</i>	BSGFV	Equador
AJ968435	<i>Banana streak goldfinger vírus</i>	BSGFV	Uganda
JF911406	<i>Banana streak goldfinger vírus</i>	BSGFV	Quênia
AB252638	<i>Banana streak Imove vírus</i>	BSIMV	Indonésia
HQ659760	<i>Banana streak Imove vírus</i>	BSIMV	Austrália
HQ593112	<i>Banana streak Imove vírus</i>	BSIMV	Quênia

AB252637	<i>Banana streak Mysore vírus</i>	BSMyV	Indonésia
AY805074	<i>Banana streak Mysore vírus</i>	BSMyV	Austrália
EU140339	<i>Banana streak Mysore vírus</i>	BSMyV	Índia
FJ594882	<i>Banana streak obinoI'Ewai vírus</i>	BSOLV	China
AJ968427	<i>Banana streak obinoI'Ewai vírus</i>	BSOLV	Uganda
JQ409539	<i>Banana streak obinoI'Ewai vírus</i>	BSOLV	Índia
NC015502	<i>Banana streak Uganda A vírus</i>	BSUgAV	Quênia
JF911400	<i>Banana streak Uganda A vírus</i>	BSUgAV	Quênia
HQ593107	<i>Banana streak Uganda A vírus</i>	BSUgAV	Quênia
AJ968464	<i>Banana streak Uganda C vírus</i>	BSUgCV	Uganda
HQ593108	<i>Banana streak Uganda I vírus</i>	BSUgIV	Uganda
HQ593109	<i>Banana streak Uganda L vírus</i>	BSUgLV	Uganda
HQ593110	<i>Banana streak Uganda M vírus</i>	BSUgMV	Uganda
AJ968558	<i>Banana streak Uganda M vírus</i>	BSUgMV	Uganda
M89923	<i>Sugarcane bacilliform vírus</i>	ScBV	Estados Unidos

Enzimas de Restrição

Após o término da reação de RCA e a confirmação da amplificação por eletroforese, os isolados foram submetidos à restrição com as seguintes enzimas: EcoRI, KpnI, PstI, SacI, XbaI, XhoI, conforme proposto James et al. (2011a). As reações, para digestão enzimática, seguiram as instruções do fabricante (PROMEGA) e o seu produto foi analisado por eletroforese em gel de agarose a 1%, contrastado com GelRed™ (Biotium Corp.) e visualizado em fotodocumentador.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

PCR

Das quarenta e uma amostras testadas, com suspeita de infecção pelo BSV, todas foram PCR positivas, porém apenas 31 foram RCA positivas, enquanto que as outras dez foram negativas (Tabela 3), mostrando que o PCR deve ter detectado fragmentos do genoma viral incompleto, integrados ao genoma da bananeira. Posteriormente não se encontraram nessas plantas o genoma circular completo do vírus, o que resultou em RCA negativo. Notou-se, portanto, que cerca de 25% das amostras, se testadas apenas por PCR, seriam diagnosticadas como falso-positivas, indicando que a técnica RCA, como já verificado por outros autores (JAMES et al., 2011a, 2011b; WAMBULWA et al., 2012) pode ser uma alternativa bastante eficiente para impedir o descarte de materiais que contêm inserção de fragmentos incompletos do BSV em seus genomas. Verifica-se que estes podem ser encontrados tanto nas espécies de banana com genoma A como com genoma B, enquanto que os genomas completos têm sido encontrados apenas naquelas com genoma B (GAYRAL et al., 2008; GEEERING et al., 2001, 2005b; JAMES et al., 2011b). Das plantas que foram PCR positivas e RCA negativas, três possuíam o genoma A enquanto que as demais eram híbridas, contendo ambos os genomas A e B.

Na Figura 1 pode ser observado o resultado de um dos testes em que 28 amostras de bananeira que foram PCR positivas resultaram em 19 amostras RCA positivas e 8 amostras RCA negativas para infecção com o

BSV. Apesar de terem sido empregados diversos pares de primers (dados não mostrados), nem todos propiciam a obtenção de resultados positivos no PCR., sendo que os primers BadnaFP e BadnaRP (YANG et al., 2003), 1A e 4' (HARPER et al., 2002), BSV4673F e BSV5317R (HARPER; HULL, 1998) foram os que apresentaram maior eficiência.

Tabela 3 Origem das amostras de bananeira analisadas, resultados dos testes de diagnose empregando as técnicas de PCR e RCA, denominação dos isolados detectados nas amostras que foram PCR e RCA positivas

Nº da Amostra	Genó- tipo	Cultivares	Município	Estado	PCR	RCA	Denominação dos isolados
1	AAB	Brs conquista	Manaus	Amazonas	+	+	*AM-CONQ 1
2	AAB	Brs conquista	Manaus	Amazonas	+	+	AM-CONQ 2
3	AAB	Brs conquista	Manaus	Amazonas	+	+	AM-CONQ 3
4	AAB	Brs conquista	Manaus	Amazonas	+	+	AM-CONQ 4
5	AAB	Brs conquista	Manaus	Amazonas	+	+	AM-CONQ 5
6	AAB	Brs conquista	Manaus	Amazonas	+	+	AM-CONQ 6
7	AAB	Tap maeo	Manaus	Amazonas	+	+	*AM-TAPM 1
8	AAB	Tap maeo	Manaus	Amazonas	+	-	
9	AAB	Tap maeo	Manaus	Amazonas	+	+	AM-TAPM 3
10	AAB	Tap maeo	Manaus	Amazonas	+	-	
11	AAB	Tap maeo	Manaus	Amazonas	+	+	AM-TAPM 5
12	AAB	Tap maeo	Manaus	Amazonas	+	+	AM-TAPM 6
13	AAA	Caipira	Cruz das /Almas	Bahia	+	+	*BA-CAI 1
14	AAA	Caipira	Cruz das /Almas	Bahia	+	-	
15	AA	M53	Cruz das /Almas	Bahia	+	+	*BA-M 53
16	AAB	Prata anã	Cruz das /Almas	Bahia	+	+	BA-PAN
17	AA	Jari buaya	Cruz das /Almas	Bahia	+	+	BA-JABU
18	AAB	Brs conquista	Cruz das /Almas	Bahia	+	-	
19	AAB	Prata catarina	Missão Velha	Ceará	+	+	*CE-PRCA 1
20	AAB	Prata catarina	Missão Velha	Ceará	+	-	
21	AAB	Prata catarina	Missão Velha	Ceará	+	-	
22	AAB	Prata catarina	Missão Velha	Ceará	+	+	CE-PRCA 4
23	AAB	Prata catarina	Missão Velha	Ceará	+	+	CE-PRCA 5
24	AAB	Prata catarina	Missão Velha	Ceará	+	-	

“Tabela 3, conclusão”

Nº da Amostra	Genó- tipo	Cultivares	Município	Estado	PCR	RCA	Denominação dos isolados
25	AAB	Prata catarina	Missão Velha	Ceará	+	+	CE-PRCA 7
26	AAB	Prata anã	Sete Lagoas	Minas Gerais	+	-	
27	AAB	Prata anã	Sete Lagoas	Minas Gerais	+	+	*MG-PAN 2
28	AAAB	Maçã	Lavras	Minas Gerais	+	+	*MG-MA1
29	AAAB	Brs platina	Sete Lagoas	Minas Gerais	+	+	MG-BRPL
30	AAAB	Brs platina	Andradas	Minas Gerais	+	+	MG-BRPL2
31	AAA	Grande naine	Sete Lagoas	Minas Gerais	+	+	*MG-GRN
32	AAAB	Phia	Ribeirão Vermelho	Minas Gerais	+	+	*MG-PHIA
33	AAB	Prata anã	Lavras	Minas Gerais	+	+	MG-PAN3
34	AAAB	Brs platina	Cruz das /Almas	Minas Gerais	+	+	MG-PLAT
35	AAA	Caturra	Guaratuba	Paraná	+	+	*PR-CAT 1
36	AAA	Caturra	Guaratuba	Paraná	+	+	PR-CAT 2
37	AAA	Caturra	Guaratuba	Paraná	+	-	
38	AAA	Caturra	Guaratuba	Paraná	+	-	
39	AAB	Prata anã	Aracaju	Sergipe	+	+	*SE-PAN 1
40	AAAB	Prata	Aracaju	Sergipe	+	+	SE- PRA 1
41	AAAB	Prata	Aracaju	Sergipe	+	+	SE- PRA 2

* isolados que foram sequenciados e analisados.

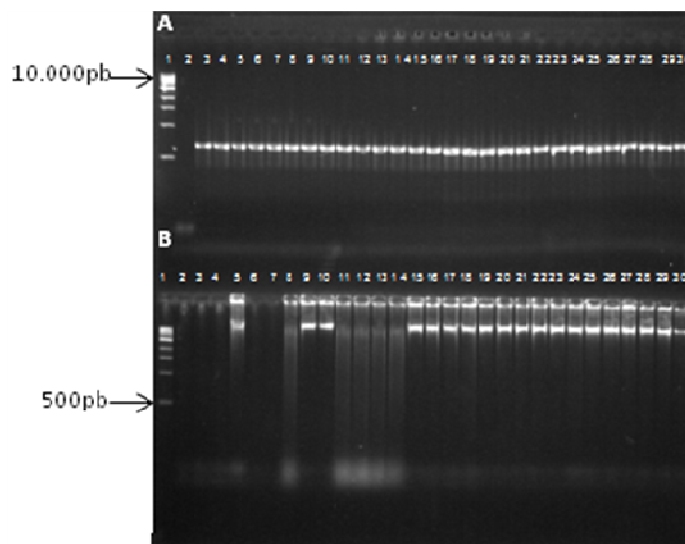


Figura 1 Análise eletroforéticas em gel de agarose dos produtos da PCR e da RCA

Nota: A: produtos da PCR: 1- Marcador 1Kb ; 2- controle negativo; 3 a 30- amostras de bananeira com suspeita de infecção por BSV, mostrando as bandas que indicam a presença do vírus. B: produtos da RCA: 1- Marcador 1Kb ; 2- controle negativo; 3,4,6 e 7, 11, 12, 13 e 14: ausência de bandas em amostras negativas; 9, 10 e 15 a 30: bandas típicas do resultado positivo em RCA

Análise das Sequências

Onze isolados foram escolhidos entre as amostras que foram PCR e RCA positivos e tiveram um fragmento de 540 pb, localizado na região codificadora da RT/RNaseH, amplificado com o par de primers BadnaFP e BadnaRP (YANG et al., 2003), sequenciado e analisado. Estes isolados foram comparados entre si e com isolados semelhantes disponíveis no GenBank.

Com base na sequência de nucleotídeos, quando comparados entre si, 2 isolados mineiros, MG-GRN e MG-PA2, e um baiano, BA-M53, apresentaram uma maior identidade entre eles, variando entre 95 e 99%. O isolado AM-TAPM1, do Amazonas, também apresentou uma identidade relativamente alta com esses três isolados, variando de 81 a 82%. O isolado PR-CAT1 do Paraná, por sua vez, apresentou uma identidade de 96% com o isolado mineiro, MG-PHIA e 92% com o isolado SE-PAN1, do Sergipe. Finalmente o isolado baiano BA-CAI1 mostrou uma identidade de 80% com o MG-MA-1. Os outros dois isolados AM-CONQ-1 de Manaus e CE-PRCA-1 do Ceará, apresentaram identidades entre 66 e 72%, mostrando que são variantes genéticas distintos dos demais.

Quando comparados com os demais isolados do GenBank, e verificando-se que o critério para que duas espécies sejam consideradas iguais é que elas devem ter um mínimo de 80% de identidade de nucleotídeos (FAUQUET et al., 2005) os isolados MG-GRN, BA-M53, MG-PA2 e AM-TAPM1 apresentaram identidades entre 81 e 96% com o Isolado AJ968464 da Uganda, pertencente à espécie *Banana streak Uganda C vírus*, indicando que esses isolados devem pertencer a essa espécie. O isolado BA-CAI1, apresentou identidades entre 96 e 98% com isolados FJ594882, AJ968427 e JQ409539 da China, Uganda e Índia, respectivamente, pertencentes à estirpe *Banana streak obinoI'Ewai vírus* (BSOLV). Outro isolado que também apresentou 79 a 80% de identidade com esses isolados foi o MG-MA1, o que o coloca, também, como sendo um BSOLV. O isolado AM-CONQ1, que não havia apresentado similaridade significativa com nenhum outro isolado brasileiro,

apresentou identidades de 99% com os três isolados pertencentes ao variante denominado *Banana streak Mysore vírus* (BSMyV) AB252637, NC_006955 e EU140339, da Indonésia, Nigéria e origem desconhecida, respectivamente. Os demais isolados apresentaram identidades abaixo de 80% com todos os isolados do GenBank utilizados para comparação.

Considerando-se a sequência de aminoácidos, os resultados obtidos com os nucleotídeos foram confirmados, ou seja, os isolados MG-GRN, BA-M53, MG-PA2 e AM-TAPM1 apresentaram maior identidade com o isolado *Banana streak Uganda C vírus*, os isolados BA-CAI e MG-MA1, apresentaram maior identidade com isolados BSOLV, e o isolado MG-PHIA ficou com classificação indefinida, pois apesar da identidade de nucleotídeos com os isolados dessa espécie ter sido de 74%, apresentou uma identidade maior de aminoácidos, ou seja, de 80%. Um único isolado isolado, o AM-CONQ1, foi classificado como BSMyV, enquanto que os outros três isolados apresentaram identidades inferiores a 80%. A menor identidade de aminoácidos, variando entre 26 e 43% foi verificada no isolado CE-PRCA-1, do Ceará, indicando que esse é um isolado completamente diferente de todos aqueles que já estão descritos na literatura.

É interessante observar que, apesar do isolado PRC-CAT1 ter apresentado uma identidade de 96% com o MG-PHIA, sua identidade de aminoácidos com os isolados da espécie BSOLV foi de 77%, não tendo, portanto, atingido os 80% necessários para ser classificado nessa espécie. Tudo indica que tanto o PRC-CAT1 como o SE-PAN1, que apresentaram mais de 80% de identidade entre si, sejam candidatos a constituir uma

nova espécie ainda não descrita. Isso mostra a complexidade que essa variabilidade implica na classificação dos variantes genéticos do BSV.

A variabilidade do BSV tem sido relatada em diversos países onde esse vírus tem sido estudado (BRIOSO; PEREIRA; GASPAROTO, 2011; FIGUEIREDO et al., 2006; GEERING et al., 2000, 2005b; HARPER et al., 2005; HARPER; HULL, 1998; LHEREUX et al., 2007; LOMBARDI; HARAKAVA; COLARICCIO, 2010; POLTRONIERI et al., 2009).

No Brasil, diversos variantes genéticos têm sido relatados, denominados BRSV-BR1, BRSV-BR2, BRSV-BR3 e BRSV-BR4 (FIGUEIREDO; BRIOSO, 2007; FIGUEIREDO et al., 2006), além de um variante genérico causando lesões necróticas nos frutos de bananeira no Amazonas (BRIOSO; PEREIRA; GASPAROTO, 2011). Porém, em nenhum desses casos foi feito o sequenciamento genético do genoma episomal desses isolados, de modo que esse é o primeiro trabalho que identifica de maneira conclusiva alguns dos variantes que ocorrem no Brasil.

O sequenciamento da região da RT/RNaseH dos isolados brasileiros, que é a região empregada para classificação do BSV em diferentes espécies (GAYRAL; ISKRA-CARUANA, 2009; GEERING; PARRY; THOMAS, 2011; JAMES et al., 2011a, 2011b; WAMBULWA et al., 2012), permitiu reconhecer as espécies Uganda C, BSOLV e *Mysore*, além de outros variantes, como o PR-CAT1 e o SE-PAN1 que apresentaram identidades abaixo de 80% com os isolados já descritos e o CE-PRCA que é completamente diferente, ou seja, apresenta identidade de nucleotídeo abaixo de 70% e de aminoácidos abaixo de 50% com as espécies conhecidas.

As árvores filogenéticas, dos isolados brasileiros, construídas com base nas sequências de nucleotídeos e de aminoácidos ficaram idênticas, e mostraram a separação dos isolados em dois clados distintos, contendo três subgrupos: um contendo os isolados PR-CAT1, MG-PHIA e SE-PAN1, que apresentaram identidades mais baixas com os isolados do GenBank, outro contendo BA-CAI1 e MG-MAI1 e o último grupo com apenas o isolado AM-CONQ1. No segundo clado, o CE-PRCA1, também, ficou separado em um grupo, enquanto que um segundo grupo, subdividido em dois subgrupos, apresentou o AM-TAPM1 isolado em um deles e os demais três isolados no segundo subgrupo.

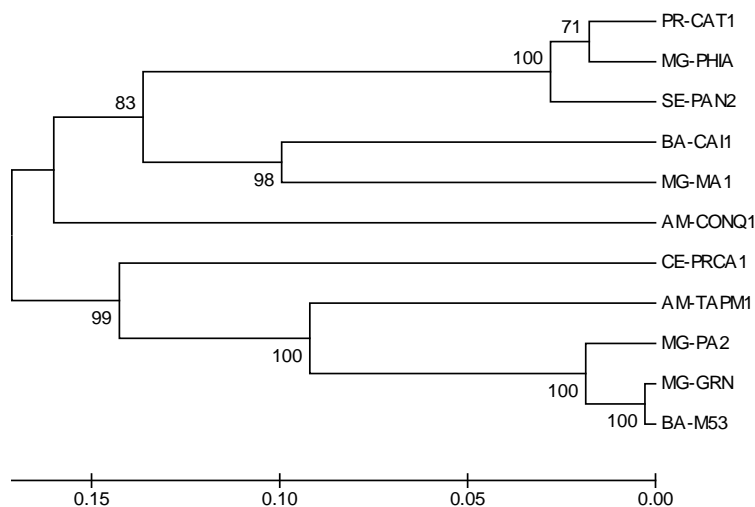


Figura 2 Árvore filogenética construída com base na sequência de nucleotídeos dos isolados brasileiros

Nota: Os valores de bootstrap foram obtidos pelo programa MEGA e Neighbour Joining, com 2.000 repetições.

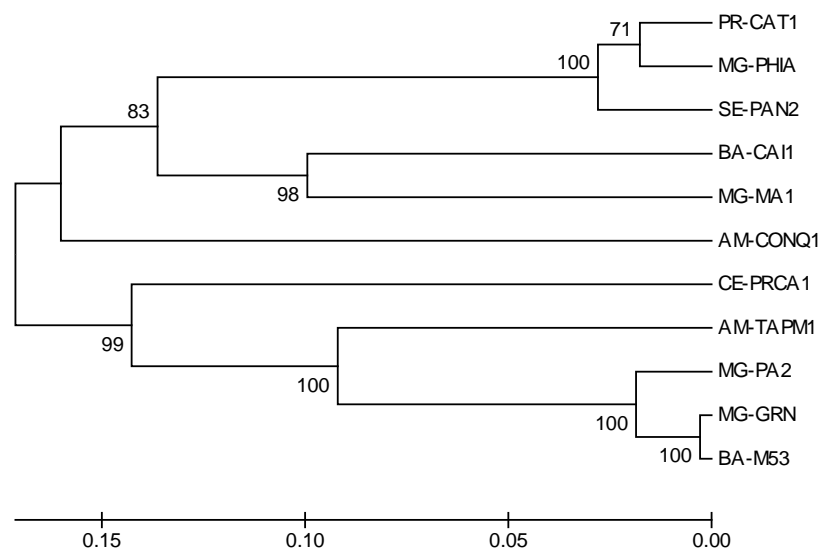


Figura 3 Árvore filogenética construída com base na sequência de aminoácidos dos isolados brasileiros

Nota: Os valores de bootstrap foram obtidos pelo programa MEGA e Neighbour Joining, com 2.000 repetições.

As árvores filogenéticas construídas, considerando as sequências de nucleotídeos e aminoácidos de todos os isolados, também, foram semelhantes, com poucas variações. Os isolados se agruparam por espécie, com o isolado CE-PRCA1 agrupado, separadamente, em ambas as árvores.

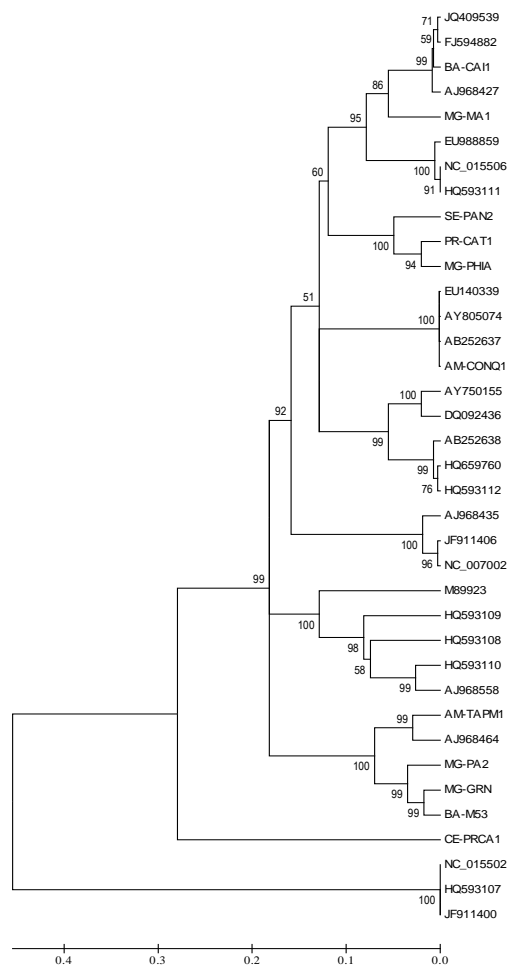


Figura 4 Árvore filogenética construída, considerando a sequência de nucleotídeos

Nota: Os valores de bootstrap foram obtidos pelo programa MEGA e Neighbour Joining, com 2.000 repetições.

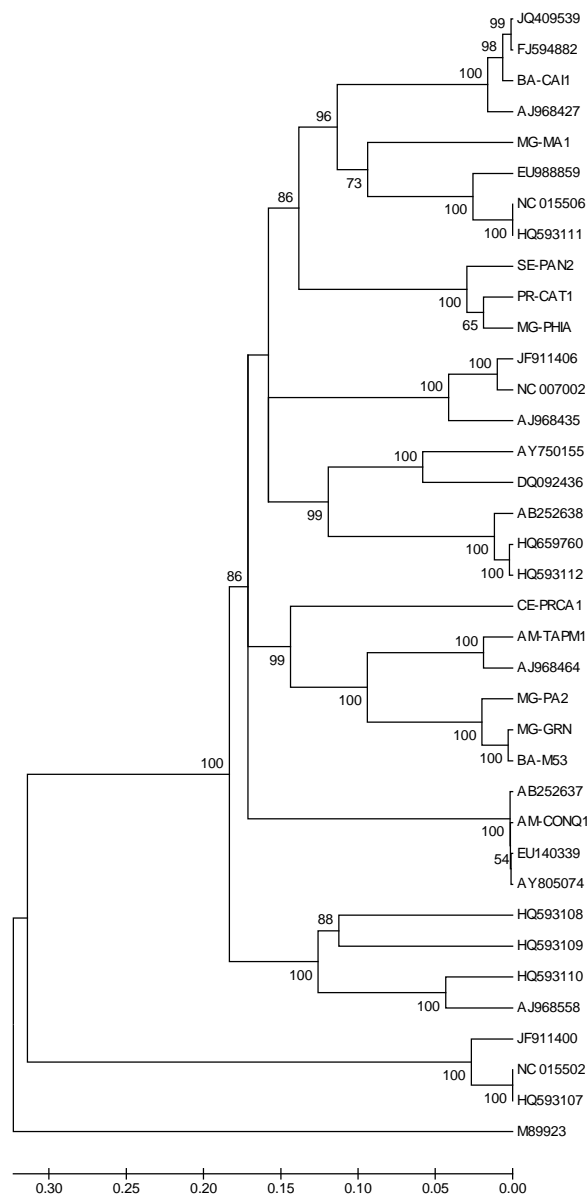


Figura 5 Árvore filogenética construída, considerando a sequência de aminoácidos

Nota: Os valores de bootstrap foram obtidos pelo programa MEGA e Neighbour Joining, com 2.000 repetições.

Tabela 4 Identidade de nucleotídeos entre os isolados brasileiros e os isolados disponíveis no 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	30	31	32	33	34	35	36	37
1 MG-GRN	99	66	72	65	66	71	95	71	68	81	67	65	64	68	67	67	71	72	71	66	66	66	70	70	70	49	49	81	66	66	67	65	48	70	69	47
2 BA-M53	-	66	71	65	65	70	96	72	68	82	67	64	65	68	67	67	71	72	71	66	66	66	69	70	69	52	52	81	65	65	67	66	47	70	68	49
3 AM-CONQ1		-	70	68	69	71	67	68	70	68	65	65	67	71	71	71	69	69	68	99	99	99	70	69	69	51	51	68	68	67	64	64	49	73	69	49
4 BA-CAI1			-	74	74	80	70	70	73	65	68	69	68	77	77	77	74	74	74	70	70	70	96	98	98	50	50	65	70	67	69	69	43	73	71	53
5 PR-CAT1				-	96	74	65	68	92	67	68	69	70	73	73	73	70	70	70	68	68	68	73	73	73	51	51	66	67	65	66	67	53	69	69	50
6 MG-PHIA					-	75	66	69	95	68	69	70	70	74	74	74	71	71	71	69	69	69	74	74	74	51	51	67	68	66	67	68	51	70	70	46
7 MG-MA1						-	70	72	73	70	73	72	72	81	80	80	73	73	72	71	70	70	80	80	79	29	29	70	69	69	69	70	46	74	73	54
8 MG-PA2							-	73	67	82	67	65	65	68	68	68	72	73	72	66	66	66	69	69	69	48	48	81	67	68	69	68	47	68	70	52
9 CE-PRCA1								-	68	74	68	67	68	72	70	70	71	71	71	68	67	68	70	70	70	47	47	73	66	71	67	69	49	68	72	42
10 SE-PAN1									-	68	69	69	70	73	73	73	70	71	70	70	70	70	73	72	72	50	50	68	65	64	65	66	48	68	68	51
11 AM-TAPM1										-	69	67	68	69	67	67	69	68	69	69	67	68	66	65	65	53	53	96	64	65	66	67	48	69	70	48
12 AJ968435											-	91	92	73	71	71	71	71	70	65	65	65	68	68	67	50	50	68	65	67	66	65	46	71	70	50
13 JF911406												-	98	73	69	69	69	70	70	66	65	65	68	68	68	50	50	66	65	65	65	63	45	69	69	47
14 NC_007002													-	73	68	68	69	70	70	67	67	68	68	67	67	49	49	67	64	65	65	62	45	69	69	48
15 EU988859														-	94	94	75	75	75	71	71	71	76	76	76	29	29	69	68	70	66	68	45	73	72	52
16 NC_015506															-	100	75	75	75	70	70	71	75	77	77	30	30	67	70	69	67	70	46	74	71	55
17 HQ593111																-	75	75	75	70	70	71	75	77	77	30	30	67	70	69	67	70	46	74	71	55
18 HQ659760																	-	97	99	69	68	69	75	74	73	53	53	69	68	66	69	69	46	78	77	48
19 AB252638																		-	97	69	69	69	75	74	74	53	53	68	68	67	69	69	45	77	76	51
20 HQ593112																			-	68	68	68	75	73	73	54	54	69	68	66	69	69	45	77	77	48

“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	30	31	32	33	34	35	36	37	
21 AB2526 37																				-	99	99	70	70	70	51	51	69	68	67	64	64	49	74	70	50	
22 EU1403 39																					-	99	70	69	69	51	51	68	68	67	64	64	49	73	69	50	
23 AY8050 74																						-	70	70	69	51	51	68	68	67	64	64	49	73	69	50	
24 AJ96842 7																							-	97	96	51	51	65	69	66	69	69	45	73	71	52	
25 JQ40953 9																								-	99	50	50	64	70	66	70	69	44	72	71	52	
26 FJ59488 2																									-	49	49	65	70	66	69	69	44	72	71	52	
27 NC_015 502																											-	100	55	52	48	46	49	51	49	51	94
28 HQ5931 07																												-	55	52	48	46	49	51	49	51	94
29 AJ96846 4																													-	65	63	66	67	48	69	69	52
30 HQ5931 08																														-	78	77	77	45	68	65	51
31 HQ5931 09																														-	78	77	46	68	68	50	
32 HQ5931 10																															-	91	47	66	68	55	
33 AJ96855 8																																-	48	65	66	53	
34 M89923																																	-	48	48	50	
35 AY7501 55																																		-	88	53	
36 DQ0924 36																																			-	53	
37 JF91140 0																																				-	

Tabela 5 Identidade de aminoácidos entre os isolados brasileiros e os isolados disponíveis no 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	30	31	32	33	34	35	36	37
1	MG-GRN	96	67	65	62	65	64	93	43	61	87	61	62	62	64	65	65	67	67	68	67	66	67	64	65	64	22	22	83	58	58	60	61	59	68	66	22
2	BA-M53	-	66	65	61	63	63	92	49	60	85	60	61	61	63	65	65	66	66	67	66	65	66	63	64	63	23	23	82	59	58	60	61	59	67	66	23
3	AM-CONQ1	-	75	70	72	73	68	37	67	66	64	65	65	73	74	74	73	73	73	100	99	100	75	75	75	27	27	65	62	63	62	62	61	76	75	27	
4	BA-CAI1	-	76	79	88	67	40	73	67	70	71	71	84	85	85	79	80	78	75	74	75	97	98	98	31	31	66	61	61	62	63	61	76	75	31		
5	PR-CAT1	-	96	77	63	36	88	64	66	68	68	75	74	74	72	71	73	70	69	70	77	77	77	27	27	62	62	60	62	62	59	70	71	27			
6	MG-PHIA	-	81	66	39	91	66	70	71	71	77	77	77	76	75	76	72	72	80	80	80	30	30	65	65	63	66	66	62	73	74	30					
7	MG-MA1	-	66	37	74	64	72	73	73	85	85	85	78	79	78	73	73	73	89	90	89	30	30	63	62	60	61	61	62	75	76	30					
8	MG-PA2	-	45	63	88	63	64	64	66	67	67	68	68	68	68	68	68	68	66	66	66	25	25	86	60	61	60	62	62	68	67	25					
9	CE-PRCA1	-	39	42	34	35	35	38	39	39	40	40	40	37	36	37	40	40	40	26	26	43	36	37	35	35	35	40	41	26							
10	SE-PAN1	-	62	65	66	66	72	72	72	71	70	71	67	66	67	75	75	75	30	30	61	60	60	60	60	60	57	69	69	30							
11	AM-TAPM1	-	62	63	63	63	65	65	68	68	68	66	65	66	66	66	66	23	23	93	59	60	61	63	61	67	68	23									
12	AJ968435	-	96	96	71	71	71	70	71	71	64	63	64	71	71	70	25	25	61	60	60	63	63	60	70	67	25										
13	JF911406	-	99	71	71	71	71	72	71	65	64	65	71	71	71	26	26	62	61	60	63	63	59	70	68	26											
14	NC_007002	-	71	71	71	71	72	71	65	64	65	71	71	71	26	26	62	61	61	63	63	59	70	68	26												
15	EU988859	-	98	98	77	77	76	73	72	73	83	84	83	30	30	62	61	62	62	61	62	62	61	75	75	30											
16	NC_015506	-	100	77	77	76	74	73	74	84	85	85	31	31	63	61	63	62	63	62	63	62	75	75	31												
17	HQ593111	-	77	77	76	74	73	74	84	85	85	31	31	63	61	63	62	63	62	75	75	31															
18	HQ659760	-	98	99	73	73	73	80	80	79	27	27	67	61	62	63	63	61	90	88	27																
19	AB252638	-	98	73	73	73	80	80	80	27	27	67	61	62	63	63	62	88	87	27																	
20	HQ593112	-	73	72	73	79	79	78	27	27	67	62	63	63	63	62	89	88	27																		
21	AB252637	-	99	100	75	75	75	27	27	65	62	63	62	62	61	76	75	27																			
22	EU140339	-	99	74	75	74	26	26	64	61	63	61	61	61	75	74	26																				
23	AY805074	-	75	75	75	27	27	65	62	63	62	62	61	76	75	27																					
24	AJ968427	-	98	98	30	30	65	61	61	62	62	61	76	76	30																						
25	JQ409539	-	99	31	31	65	62	61	62	63	62	76	76	31																							
26	FJ594882	-	31	31	65	61	61	61	62	61	76	75	31																								
27	NC_015502	-	100	22	25	25	23	24	25	26	26	100																									

“Tabela 5, conclusão”

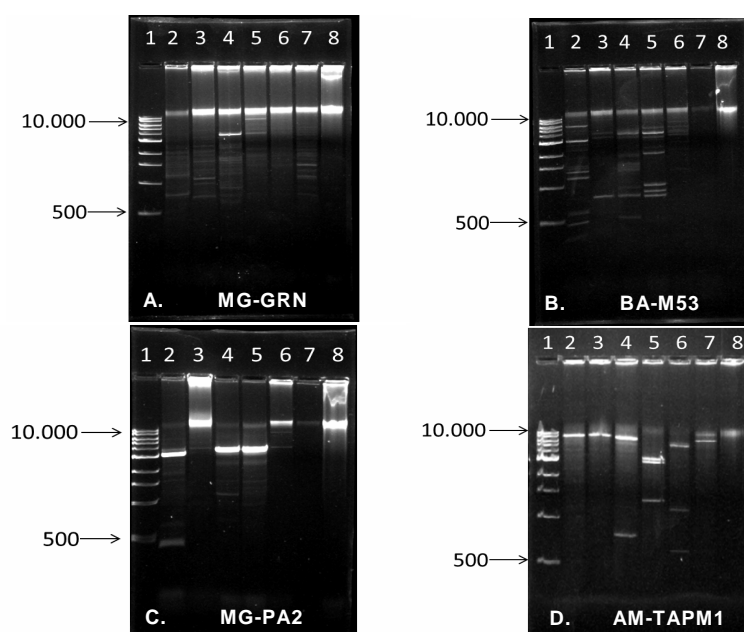
N°	Isolados	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	
28	HQ593107																												-	22	25	25	23	24	25	26	26	100
29	AJ968464																													-	57	58	59	61	60	66	67	22
30	HQ593108																													-	83	86	84	74	62	61	25	
31	HQ593109																														-	84	85	75	63	62	35	
32	HQ593110																														-	95	75	63	63	23		
33	AJ968558																														-	76	63	63	24			
34	M89923																															-	60	60	25			
35	AY750155																																	-	96	26		
36	DQ092436																																		-	26		
37	JF911400																																			-		

Esse estudo possibilitou concluir que, como acontece em outras partes do mundo onde a bananeira é cultivada, existe uma grande variabilidade nos isolados de badnavirus que estão associados ao sintoma de streak da bananeira no Brasil. Além disso, nas árvores filogenéticas não foi encontrado um agrupamento de isolados em clados específicos por região. Esse fato pode estar diretamente relacionado com o fluxo comercial entre os centros de produção de mudas e seus compradores, que se encontram amplamente distribuídos no país. Outro fator que pode explicar as diferenças genômicas é o fluxo gênico que ocorre no cruzamento entre diferentes variedades de bananeira usadas, experimentalmente, para o lançamento de variedades resistentes a determinados patógenos. Essas modificações podem ser suficientes para enquadrar o isolado em uma nova espécie. Outro fator predisponente a essa variação poderia ser a integração do genoma viral na planta, considerada como uma estratégia parasitária por alguns autores (GAYRAL; BLONDIN; GUIDOLIN, 2010; GAYRAL et al., 2008).

Neste trabalho apresentou-se, de forma pioneira, as evidências moleculares da ocorrência de algumas espécies já conhecidas de BSV no Brasil, bem como da ocorrência de espécies com características bastantes distintas, devendo estas constituir novas espécies, ainda não descritas em outras partes do mundo.

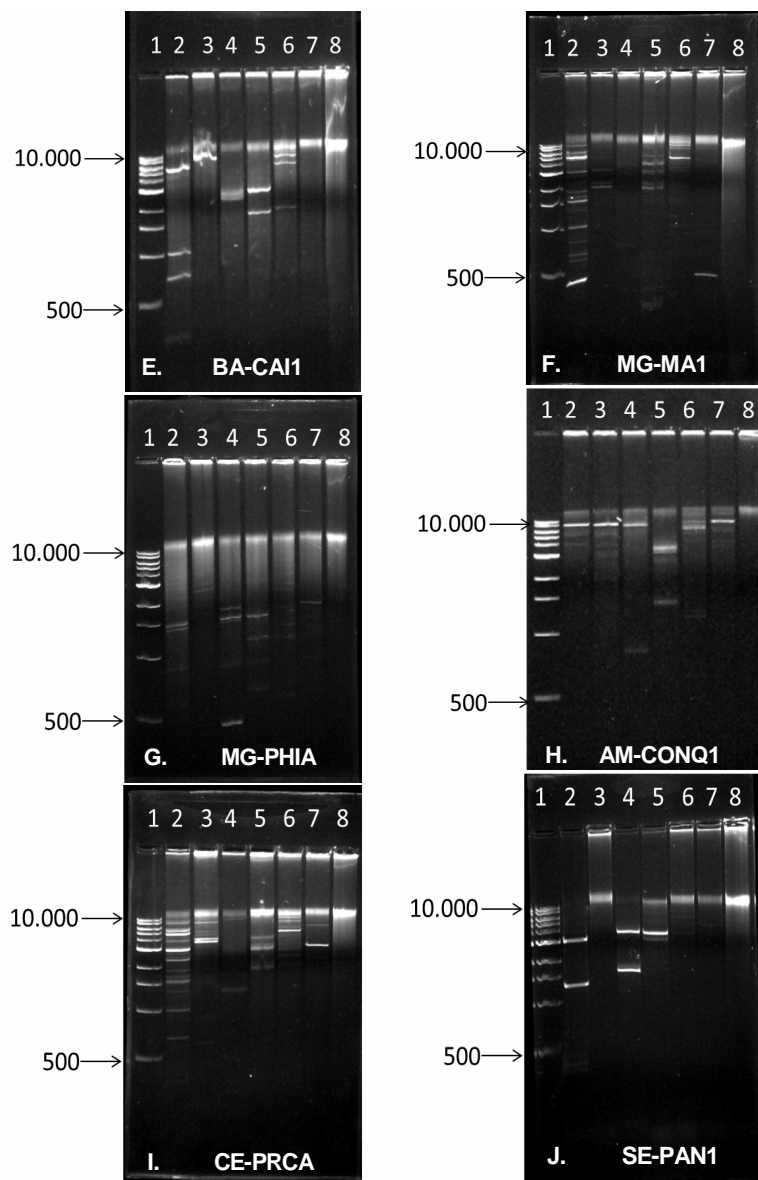
4 RESULTADO DA RESTRIÇÃO ENZIMÁTICA DOS PRODUTOS DO RCA

A restrição enzimática dos produtos de RCA pode ser vista na Figura 8 (A a K). Como se pode observar, as bandas obtidas, quando se fez a restrição enzimática com sete enzimas de restrição (1,2,3,4,5,6,7) dos isolados representados na Figura 8A a 8D, que, pela análise de nucleotídeos, pertencem à estirpe *Banana streak Uganda C* vírus, não apresentaram o mesmo padrão. O mesmo aconteceu com os isolados BA-CAI1 E MGMA1 (Figura 8E e 8F), que apresentaram bandas distintas quando digeridos com as mesmas enzimas de restrição.



(...continua...)

(Figura 9, continua...)



(...continuação...)

(Figura 9, conclusão)

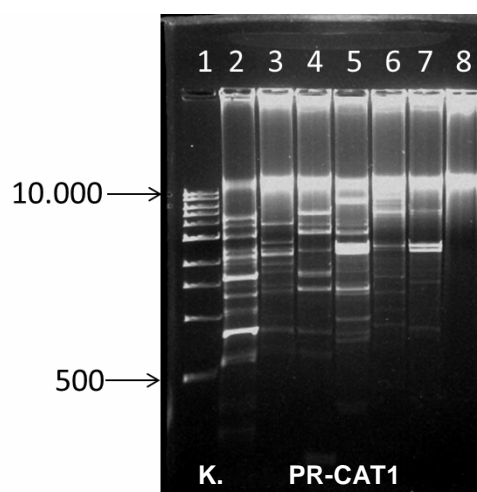


Figura 6 Análise eletroforética dos produtos das restrições enzimáticas realizadas com os genomas dos 11 isolados de Badnavirus, amplificados por RCA

Nota: A → K: M: 1 Kb DNA ladder; 2: EcorI; 3: KpnI; 4: PstI; 5: SacI; 6: XbaI; 7: XhoI; 8: controle, constituído pelo produto do RCA sem digerir.

Da mesma forma, os demais isolados apresentaram padrões distintos de bandas, tanto entre si como quando comparados com outros trabalhos já publicados, que apresentaram padrões de digestões específicos para as diferentes espécies de badnavírus já descritas, capazes de causar o sintoma de streak em bananeiras (GEERING et al., 2001; JAMES et al., 2011a). Isso mostra a necessidade de se realizar o sequenciamento completo desses isolados, para determinar se essas

diferenças no padrão de restrição entre isolados da mesma espécie é confirmada pela sequência de nucleotídeos ou se elas poderiam ser relacionadas a alguma dificuldade na digestão dos produtos do RCA, pois em virtude de sua peculiaridade e o modo de amplificação da polimerase empregada poderia dificultar o acesso das enzimas de restrição aos respectivos sítios no genoma, gerando bandas maiores. Desse modo, esse é um aspecto que deve ser melhor investigado em experimentos futuros.

ABSTRACT

This study confirms the efficiency of the “Rolling circle amplification” (RCA) technique for diagnosing the *Banana streak virus* (BSV), without the occurrence of false positives, which means a challenge to be met by the seedling producers and by the indexation centers. We collected 41 samples of banana plants suspected of virus infection in four of the five Brazilian regions, in order to determine their identity in comparison to isolates described in other parts of the world, based on the molecular analysis of the RT/RNaseH gene. These samples were analyzed and submitted to PCR and RCA tests. All samples were positive in the PCR test however, when analyzed by the RCA test, only 31 were positive, indicating that, if only performing analysis by PCR, 10 samples would present a false positive result. Among the positive samples on both tests, 11 isolates were chosen for sequencing and analyses. The sequence corresponding to the codifying region of the RT/RNaseH protein, from the 11 sequenced isolates, revealed an identity of nucleotides ranging from 65 to 99% among themselves, and from 42 to 99% with the isolates from the GenBank belonging to different species. The identity of amino acids ranged from 36 to 96% among the Brazilian isolates, and from 22 to 100% with virus isolated from the GenBank. Based on these identities, four isolates, dominated MG-GRN, BA-M53, MG-PA2 and AM-TP1, were classified as *Banana streak Uganda virus C* (BSUgCV), two, denominated BA-CAI1 and MG-MA1, were considered *Banana streak Obinol’Ewai virus* (BSOLV) and *Banana streak Mysore virus* (BSMyV), respectively. The MG-PHIA strain, though presenting the amino acid identity of 80% with the BSOLV species, showed a nucleotide identity below this minimum value, not being considered of this species. Three other isolates were not classified in any of the described species: the PR-CAT1 and SE-PAN1, which presented identity of 92% between one another, and therefore, are of the same species; and CE-PRCA1, which was completely different from the isolates in Brazil and from the GenBank. Attempts at employing restriction enzymes in order to characterize the species were not successful, demanding additional research. The data point to the need for further studies with the causing agents of the Brazilian banana streak, due to the large variability and genomic complexity of the isolated present in this country. In this work, we characterized, for the first time, based on genomic analysis, a few Badnavirus species which infect banana plants in Brazil, with three new species not yet described in literature being detected.

Keywords: Phytopathology. Biotechnology. *Banana streak virus*.

REFERÊNCIAS

BRIOSO, P. S. T.; PEREIRA, J. C. R.; GASPAROTO, A. 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.

DEAN, F. B. et al. Rapid amplification of plasmid and phage DNA using Phi29 DNA polymerase and multiply-primed rolling circle amplification.

Genome Research, Cold Spring Harbor, v. 11, n. 6, p. 1095-1099, June 2001.

FAUQUET, C. M. et al. Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses. In: INTERNATIONAL COMMITTEE ON TAXONOMY OF VIRUSES, 8., 2005, San Diego. **Proceedings...** San Diego: Elsevier Academic, 2005. p. 392-396.

FIGUEIREDO, D. et al. Detecção e análise da variabilidade de sequências do banana streak virus (BSV) em bananeiras no Brasil.

Summa Phytopathology, Jaguariúna, v. 10, p. 118-123, 2006.

FIGUEIREDO, D. V.; BRIOSO, P. S. T. Detecção e análise da variabilidade de sequências do banana streak virus (BSV) em bananeiras no Brasil.

Summa Phytopathology, Jaguariúna, v. 10, p. 118-123, 2006.

FIGUEIREDO, D. V.; BRIOSO, P. S. T. PCR multiplex para a detecção de BSV e CMV em bananeiras micropropagadas. **Summa**

Phytopathology, Jaguariúna, v. 32, n. 2, p. 118-123, set. 2007.

GAYRAL, P.; BLONDIN, L.; GUIDOLIN, O. 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 A single banana streak virus integration event in the banana genome as the origin of infectious endogenous pararetrovirus. **Journal of Virology**, New York, 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. 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. Banana contains a diverse array of endogenous badnaviruses. **Journal of General Virology**, London, v. 86, p. 511-520, Jan. 2005a.

GEERING, A. D. W. 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. 150, n. 4, p. 787-796, Apr. 2005b.

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.

GEERING, A. D. W.; PARRY, J. N.; THOMAS, J. E. Complete genome sequence of a novel badnavirus, banana streak IM virus. **Archives of Virology**, New York, v. 156, n. 4, p. 733-737, Apr. 2011.

HARPER, B. 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. Diversity of banana streak virus isolates in Uganda. **Archives of Virology**, New York, v. 150, n. 12, p. 2407-2420, 2005.

HARPER, G.; HULL, R. Cloning and sequence analysis of banana streak virus DNA. **Virus Genes**, Norwell, v. 17, n. 3, p. 271-278, Nov. 1998.

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

JAMES, A. P. et al. Molecular characterization of six badnavirus species associated with leaf streak disease of banana in East Africa. **Annals of Applied Biology**, Warwick, v. 158, p. 346-353, 2011b.

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. Establishment of virus-free banana (*Musa* spp.) mother stock for production of certified banana plants and banana streak virus tested. **Acta Horticulturae**, The Hague, v. 879, n. 2, p. 661-668, 2010.

LHEUREUX, 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, Jan. 2007.

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

LOMBARDI, R.; HAKAKAVA, R.; COLARICCIO, A. Clonagem e purificação de fragmento da proteína capsidial de Banana streak OL virus. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 45, n. 8, p. 811-817, ago. 2010.

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION.
BLAST Assembled RefSeq Genomes. Disponível em:
<<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>>. Acesso em: 10 mar. 2013a.

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION.
Open Reading Frame Finder. Disponível em:
<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>>. Acesso em: 10 mar. 2013b.

POLTRONIEIR, L. S. et al. Constatação do banana streak Uganda B virus em bananeiras no Estado do Pará. **Summa Phytopathology**, Botucatu, v. 35, n. 1, p. 74, jan./fev. 2009.

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.

WAMBULWA, M. C. et al. Rolling circle amplification is more sensitive than PCR and serology-based methods in detection of banana streak virus in Musa Germplasm. **Biomedical & Life Sciences**, Amsterdam, v. 3, n. 11, p. 1581-1587, Nov. 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.