



JÉSSICA VIEIRA LIMA TEIXEIRA

**IDENTIFICAÇÃO DE ESPÉCIES DE *Badnavirus*
INFECTANDO BANANEIRA NO BRASIL**

**LAVRAS-MG
2020**

JÉSSICA VIEIRA LIMA TEIXEIRA

**IDENTIFICAÇÃO DE ESPÉCIES DE *Badnavirus* INFECTANDO
BANANEIRA NO BRASIL**

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

Dra. Antônia dos Reis Figueira
Orientadora

**LAVRAS-MG
2020**

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

Teixeira, Jéssica Vieira Lima.

Identificação de espécies de *Badnavirus* infectando bananeira
no Brasil / Jéssica Vieira Lima Teixeira. - 2020.

41 p. : il.

Orientador(a): Antônia dos Reis Figueira.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de
Lavras, 2020.

Bibliografia.

1. Sequenciamento. 2. estrias da bananeira. 3. RCA. I. Figueira,
Antônia dos Reis. II. Título.

JÉSSICA VIEIRA LIMA TEIXEIRA

**IDENTIFICAÇÃO DE ESPÉCIES DE *Badnavirus* INFECTANDO
BANANEIRA NO BRASIL
IDENTIFICATION OF *Badnavirus* SPECIES INFECTING BANANA IN
BRAZIL**

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

APROVADA em 30 de Outubro de 2020.

Dra. Sttela Dellyzete Veiga Franco da Rosa Embrapa Café
Dr. Ricardo Magela de Souza origem UFLA

Dra. Antônia dos Reis Figueira
Orientadora

**LAVRAS-MG
2020**

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me conceder o dom da vida e por ser minha fortaleza nos momentos mais difíceis.

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

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

À Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), em especial à Renata de Barros Ramos Oliveira, pelo sequenciamento dos isolados.

À minha mãe, Mônica, por sempre incentivar meus estudos, por me dar a base para eu ser quem sou hoje e por todo amor.

Ao meu namorado, Nilson, por todo amor, compreensão e apoio durante esses dois anos de mestrado.

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

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

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

Aos colegas do Laboratório de Virologia, Thalyta, Sérgio, Sandra, Lara, Franciely, Mirelly, Viviane e Carzinho e todos aqueles que conviveram comigo desde a Iniciação Científica, pela amizade e por todo ensinamento.

RESUMO

Dentre as doenças que podem afetar os bananais, as de etiologia viral apresentam grande importância por não possuírem controle curativo. Uma das viroses mais importantes é a estria da bananeira, causada por diversas espécies de vírus pertencentes ao gênero *Badnavirus*, que pode levar a perdas de até 90% na produção dos bananais. A variabilidade encontrada dentro do gênero *Badnavirus* e a capacidade de integrar total ou parcialmente o seu genoma no genoma da bananeira, tornam a sua diagnose bastante desafiadora. No Brasil poucos são os trabalhos realizados com a finalidade de identificar as espécies de *Badnavirus* que se encontram presentes nas diversas regiões onde a bananeira é cultivada. Nesse trabalho, amostras de bananeira com suspeita de infecção por *Badnavirus* foram analisadas com a finalidade de identificar o agente causal e também consolidar um método de diagnose que, além de eficiente, seja de menor custo para análises de rotina. Foram analisadas 29 amostras de bananeira de diferentes localidades de Minas Gerais, cinco da Bahia e uma do Tocantins. As amostras foram primeiramente submetidas à diagnose por PCR utilizando-se primers degenerados e, posteriormente analisadas por RCA (*rolling circle amplification*) e RT-PCR para a confirmação da presença da forma episossomal dos vírus. Dentre os 35 isolados analisados, os que apresentaram resultados positivos nas três técnicas tiveram um fragmento da RT/RNaseH com 540 pb amplificados, sequenciados e a sua espécie identificada. Das amostras analisadas, nove foram negativas e cinco positivas apenas na PCR, mostrando que se tratavam de sequências virais endógenas na bananeira. Por outro lado, 21 delas foram positivas nas três técnicas, indicando que as técnicas RCA e RT-PCR foram eficientes para a detecção da forma episossomal dos vírus, enquanto que a PCR amplificou indiscriminadamente sequências episossomais e endógenas. A análise das sequências permitiu que, com base nos critérios do ICTV que estabelece que espécies iguais devem possuir sequências com identidades de nucleotídeos $\geq 80\%$, fossem identificadas cinco espécies de *Badnavirus* já descritas na literatura e uma ainda não reportada: o isolado MG-PHIA o qual apresentou identidades entre 64% e 72% com todas as espécies já descritas, não se encaixando em nenhuma delas; o isolado do Tocantins (TO-NAN) pertence à espécie *Banana streak Mysore virus* (BSMyV); os isolados MG-OC, MG-CAJU pertencem à espécie *Banana streak Obino l'Ewai virus* (BSOLV); os isolados MG- TERRI, MG- SEM, BA-BRP à espécie *Banana streak Uganda G virus* (BSUGV); os isolados MG-CAR, MG-MA3, MG-MAR, MG-NAN, BA-WIL e MG-PRGO1 mostraram pertencer à espécie *Banana streak Uganda D virus* (BSUDV) e finalmente a espécie como maior número de isolados foi a *Banana streak Uganda C virus* (BSUCV), com a qual foram identificados os isolados MG-CAV, MG-MA4, MG-PRCA, MG-PRGO2, MG-PR2, MG-OM, MG-WIL1 e MG-WIL2. A validação da técnica de RT-PCR para a diagnose de sequências episossomais dos *Badnavirus* e a identificação de espécies presentes em diferentes campos onde a banana é cultivada, é uma contribuição relevante para o sistema de produção de mudas de bananeira no Brasil.

Palavras Chaves: PCR, RT-PCR, RCA, Banana, estrias da bananeira, Sequenciamento.

ABSTRACT

Virus diseases are very important in banana crops because they do not have curative control. One of the most important viruses is the banana streak, caused by several species *Badnavirus*, which can lead to yield losses of up to 90%. The variability found within the genus *Badnavirus* and the ability to fully or partially integrate its genome into the banana genome, make its diagnosis quite challenging. In Brazil, few studies have been carried out to identify the species of *Badnavirus* that are present in the different regions where the banana tree is grown. In this work, banana samples with suspected badnavirus infection were analyzed in order to identify *Badnavirus* species and also consolidate a diagnostic method that, in addition to being efficient, would be less costly for routine diagnostic tests. 35 banana samples from different Minas Gerais regions, one from Bahia and one from Tocantins were analyzed. They were first submitted to PCR diagnosis using degenerate primers and those tested positive were analyzed by RCA (rolling circle amplification) and RT-PCR to confirm the presence of the episomal form of viruses. 33 isolates from different regions of Minas Gerais, one from Tocantins and one from Bahia were analyzed. Among the 35 isolates analyzed, those that showed positive results in the three techniques had a fragment of RT/RNAse H with 540 bp amplified, sequenced and their species was identified. Among the analyzed samples, nine were negative and five positive only in PCR, showing that they were endogenous sequences of the banana. On the other hand, 21 of them were positive in the three techniques, indicating that the RCA and RT-PCR techniques were efficient for detecting the episomal form of viruses, while the PCR indiscriminately amplified episomal and endogenous sequences. Based on the ICTV criteria that established a threshold of nucleotide identities $\geq 80\%$ for equal species, five species of badnavirus already described in the literature were identified, and also one species not yet reported, the isolated MG-PHIA, which showed identities between 65 and 72% with all the species available in GenBank, not fitting into any of them. The species of Tocantins isolate was *Banana streak Mysore virus* (BSMyV) and the remain species with respective isolates were: isolates was *Banana streak Obino l'Ewai virus* (BSOLV): MG-OC, MG-CAJU; *Banana streak Uganda G virus* (BSUGV): MG-TERRI, MG-SEM and BA-BRP; *Banana streak Uganda D virus* (BSUDV): MG-CAR, MG-MA3, MG-MAR, MG-NAN, BA-WIL and MG-PRGO1 and finally, the species with the greatest number of isolates was *Banana streak Uganda C virus* (BSUCV): MG-CAV, MG-MA4, MG-PRCA, MG-PRGO2, MG-PR2, MG-OM, MG-WIL1 and MG-WIL2. The validation of the RT-PCR technique for the diagnosis of episomal badnavirus sequences and the identification of species present in different Brazilian fields where the banana is grown, is a relevant contribution to the Brazilian certification program to produce healthy banana seedling.

Keywords: PCR, RT-PCR, RCA, Banana, banana streak, Sequencing.

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| 1. INTRODUÇÃO..... | 8 |
| 2. REFERENCIAL TEÓRICO..... | 11 |
| 2.1 A Bananicultura no Brasil..... | 11 |
| 2.2 A Estria da Bananeira | 12 |
| 2.2.1 Agentes Causais da Estria da Bananeira..... | 13 |
| 2.2.2 Métodos de Diagnose da Estria da Bananeira | 15 |
| 3. OBJETIVOS..... | 17 |
| 3.1 Objetivo Geral..... | 17 |
| 3.2 Objetivos Específicos | 17 |
| 4. MATERIAL E MÉTODOS..... | 18 |
| 4.1. Obtenção do Material Vegetal | 18 |
| 4.2. Extração do DNA total | 18 |
| 4.3. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)..... | 19 |
| 4.4. Rolling Circle Amplification (RCA) | 19 |
| 4.5. Sequenciamento e Análise das Sequências..... | 20 |
| 4.6. Extração de mRNA e RT-PCR | 20 |
| 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO | 22 |
| 5.1 Métodos de Diagnose..... | 22 |
| 5.2. Análise Filogenética | 24 |
| 6. CONCLUSÕES | 34 |
| 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 34 |

1. INTRODUÇÃO

A banana é a fruta mais consumida *in natura* no Brasil e no mundo. Possui grande importância econômica nos países tropicais, além de ser muito apreciada pelo sabor, pela facilidade de consumo, pelo baixo custo e também por ser fonte de energia, vitaminas e minerais.

O clima favorável no Brasil permite a produção e a oferta da fruta durante o ano todo. Na safra de 2019, a produção brasileira foi de 7.113.594 t, com uma área plantada de mais de 456.922 ha, tendo as regiões Nordeste e Sudeste se destacado com as maiores produtoras, contribuindo com 2.488.454 t e 2.420.779 t respectivamente (SIDRA, 2020). Geralmente a maior parte da produção do país é comercializada internamente, mas as exportações vêm apresentando uma tendência de crescimento, de modo que em 2019 as exportações brasileiras chegaram a 80.000 t (FAO, 2020).

Embora o Brasil seja considerado o quarto maior produtor da cultura, sua produtividade é considerada baixa (15,06 t/ha), o que tem sido relacionado principalmente a problemas fitossanitários (SILVA NETO & SILVA, 2009). A cultura da banana pode ser afetada por muitos patógenos como fungos, bactérias, nematoides e vírus, portanto, a escolha e a aquisição do material propagativo são fundamentais na implantação de um pomar (SILVA et al., 2013; FARGETTE et al., 2006). A introdução de mudas com baixa qualidade fitossanitária pode acarretar no aparecimento de várias doenças, influenciando de forma negativa a produção e produtividade das plantas (SILVA et al, 2004). Assim sendo, o desenvolvimento do método de produção de mudas a partir da propagação clonal tornou imprescindível o uso de matrizes comprovadamente sadias com o intuito de evitar a ocorrência de epidemias em campo (MEISSNER FILHO & BRIOSO, 2000; SILVA & CORDEIRO, 2000).

Dentre as doenças que podem afetar os bananais, as de etiologia viral apresentam grande importância, primeiramente por não possuírem controle curativo e também por ser uma cultura de propagação vegetativa favorece a perpetuação dessas doenças. No Brasil, duas são as viroses consideradas importantes em bananeira: o mosaico, causado pelo *Cucumber Mosaic Virus* (CMV) e a estria da bananeira, causada por espécies de *Badnavirus* (BRIOSO et al., 2000).

O CMV pertence à família *Bromoviridae*, gênero *Cucumovirus* que, apesar de ter sido identificado pela primeira vez em plantas de pepino, possui uma gama de hospedeiras

bastante extensa, estimada em aproximadamente 800 espécies vegetais, envolvendo frutíferas, olerícolas e ornamentais (VARVERI & BOUTSIKA, 1999; PALUKAITIS et al., 1992). Os sintomas característicos da infecção de CMV em plantas de banana são o aparecimento de manchas alongadas amarelas ou esverdeadas entre as nervuras resultando na formação de mosaico nas folhas, que podem apresentar as bordas enroladas (MEISSNER FILHO, 2011). Sua detecção é relativamente simples, podendo ser realizada tanto pelo teste sorológico ELISA como por testes moleculares mais sensíveis como o RT – PCR (JONES, 2000; LOCHART, 1990).

A estria da bananeira foi descrita pela primeira vez na Costa do Marfim por Yot-Dauthy & Bové em 1966, e somente 20 anos depois seu agente causal foi descrito (LOCKHART, 1986). Os sintomas mais típicos desta virose aparecem na lâmina foliar, inicialmente como listras cloróticas contínuas ou segmentadas, tornando-se necróticas ou com cor marrom escuro de diferentes tonalidades ao longo do tempo (BRIOSO et al., 2011; SILVEIRA et al., 2008). Dependendo da espécie, condições ambientais e suscetibilidade da planta pode causar perdas de até 90% na produção dos bananais (DANIELLS et al., 2001; DAHAL et al., 2000).

Inicialmente essa doença era atribuída a apenas uma espécie de *Badnavirus*, o *Banana streak vírus* (BSV), entretanto, hoje sabe-se que ela é causada por diversas espécies de vírus do gênero *Badnavirus*, pertencentes à família *Caulimoviridae* (SHARMA, 2015; KING, 2011). O Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (ICTV-International Committee on Taxonomy of Virus) estabeleceu que espécies distintas dentro do gênero de *Badnavirus* são aquelas que apresentam uma diferença maior que 20% na sequência de nucleotídeos do gene que codifica a RT/RNaseH, que possui cerca de 580 pb (YANG et al., 2003). Atendendo a esses requisitos, nove espécies de vírus associados à estria da bananeira já foram reconhecidas: *Banana streak MY vírus* (BSMYV), *Banana streak OL vírus* (BSOLV), *Banana streak GF vírus* (BSGFV), *Banana streak VN vírus* (BSVNV), *Banana streak IM vírus* (BSIMV), *Banana streak UA vírus* (BSUAV), *Banana streak UI vírus* (BSUIV), *Banana streak UL vírus* (BSULV) e *Banana streak UM vírus* (BSUMV) (ICTV, 2019). Outras espécies têm sido relatadas na literatura, e se encontram esperando a validação do ICTV.

Essa grande variabilidade genética constitui uma limitação nos testes diagnósticos com base em métodos sorológicos, uma vez que não se encontram disponíveis antissoros para todas as espécies de vírus já validadas ou não, além das espécies novas que têm surgido com frequência, possibilitando o surgimento de resultados falso negativos. Além disso, esses vírus

possuem a capacidade de se integrar total ou parcialmente ao genoma da planta hospedeira, gerando também limitações na sua diagnose por PCR (reação em cadeia da polimerase) (JAMES et al., 2011a; JAMES et al., 2011b), pois podem gerar resultados falso positivos.

Dois tipos de sequência integrada de *Badnavirus* têm sido identificados em bananeiras: os EPRVs que consistem de alguns fragmentos do genoma viral, de modo que são incapazes de causar infecção, e os eaBSVs, quando o genoma completo do vírus está integrado ao genoma do hospedeiro, podendo vir a se tornar infectivo sob condições específicas de estresse, como cultura de tecidos e hibridização (JAMES et al., 2011b.; COTÊ et al, 2010.; DALLOT et al., 2001; NDOWORA et al., 1999).

Assim sendo, é de grande importância conhecer as espécies de *Badnavirus* que ocorrem no campo e garantir que as mudas sejam indexadas empregando métodos precisos e confiáveis. O objetivo com esse trabalho foi analisar amostras de banana provenientes de diferentes localidades para identificação das espécies de *Badnavirus* presentes e selecionar um método de diagnose custo efetivo/ideal que possa ser utilizado na diagnose de rotina em laboratórios oficiais.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 A Bananicultura no Brasil

Originária no sul e sudeste Asiático, e com seu centro de diversidade atribuído à Malásia ou Polinésia (HESLOP-HARRISON & SCHWARZACHER, 2007; DANIELLS et al., 2001; SIMMONDS, 1962; SIMMONDS & SHEPHERD, 1955), a bananeira, gênero *Musa*, hoje é cultivada em mais de 100 países localizados entre os trópicos, na faixa compreendida entre os paralelos 30° de latitude Norte e Sul, tornando-se a fruta mais consumida in natura no mundo (FAO, 2019; DANTAS et al., 1997).

A produção mundial de banana na safra de 2018 foi de 115.737.870 t, sendo Índia, China, Indonésia e Brasil os maiores produtores da fruta, responsáveis por 48,51% da produção (FAO, 2019). Na safra de 2019 a produção da fruta no Brasil foi de 7.113.594 t, em uma área colhida de 456.922 ha. As regiões com maior produção foram a Nordeste e a Sudeste, com 2.488.454 t e 2.420.779 t respectivamente (SIDRA, 2020). Quase a totalidade da produção brasileira é comercializada internamente, sendo apenas 1,12 % (2019) da produção destinada para a exportação (SIDRA 2020; FAO 2019). O Brasil além de quarto maior produtor é considerado o maior consumidor da fruta, com um consumo anual de 25 kg per capita.

A classificação das cultivares comerciais é feita com base em características morfologias e composição genômica, uma vez que derivam, em sua maioria, das espécies selvagens *Musa accuminata* e *Musa balbisiana*, genoma A e B respectivamente. Além disso, os genomas podem ser diploides, triploides ou tetraploides, constituindo os grupos AA, BB, AB, AAA, AAB, ABB, AAAA, AAAB, AABB e ABBB (D'HONT et al., 2012; ALVES, 1999).

Essa ampla diversidade proporciona cultivares com diferentes características agronômicas como porte da planta, adaptabilidade aos diferentes climas, produtividade, tolerância a pragas, doenças, seca, frio e também possibilita ao consumidor uma gama de frutos com diferenças morfológicas e de sabor (NOMURA et al., 2013; SILVA et al., 2013; JAMESB et al., 2011; SILVA et al., 2004). As variedades mais plantadas no Brasil são a Prata, Nanica e maçã, 70%, 20% e 4% respectivamente (EMBRAPA, 2020).

A bananicultura tem grande importância social, uma vez que é cultivada em sua maioria em pequenas propriedades, se tornando parte da renda de produtores, além de ser elemento de fixação do homem ao campo, gerando emprego na área rural. E também como é

uma fruta de fácil aquisição e baixo custo se torna parte da alimentação das camadas mais carentes da população (CORDEIRO, 2000).

Mesmo o Brasil sendo considerado o quarto maior produtor de banana, sua produtividade é considerada baixa (15,56 t/ha), fato relacionado principalmente aos problemas fitossanitários (FAO, 2020; CORDEIRO, 2000). A cultura da bananeira é afetada por muitos fitopatógenos dentre eles, os fungos *Mycosphaerella musicola*, Leach, *M. fijiensis* Morelet, causadores da Sigatoka-amarela e Sigatoka-negra respectivamente, e o *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense causador do mal-do-Panamá. A doença bacteriana mais importante da cultura é o Moko da bananeira, causado pela *Ralstonia solanacearum* (raça 2) que embora ausente na região de Minas Gerais, tem limitado a produção em alguns estados brasileiros. O nematoide *Radopholus similis* tem causado perdas na cultura, uma vez que perfura o córtex das raízes e o rizoma da bananeira (SILVA, 2013).

As viroses são consideradas de grande importância, pois além de não possuírem controle curativo podem ser disseminadas pelas mudas, devido ao modo de propagação vegetativa da planta. Uma vez introduzidos na lavoura, os vírus podem ser disseminados por vetores, que são abundantes no campo, tornando a propagação de mudas sadias uma medida fundamental para o controle preventivo de viroses. No Brasil, duas são as viroses já detectados em bananeira: a estria da bananeira, causada por espécies de *Badnavirus* e o mosaico, causado pelo *Cucumber Mosaic Virus* (CMV) (BRIOSO et al., 2000). Ambas as viroses são consideradas pragas não quarentenárias regulamentadas pelo MAPA e precisam ser monitoradas nas mudas destinadas a propagação.

A estria da bananeira é uma das mais importantes para o Brasil, pois pode causar perdas de até 90% na produção dos bananais (DANIELLS et al., 2001; DAHAL et al., 2000). Para um maior controle dessas viroses é de suma importância garantir a sanidade das mudas propagadas, através de testes de diagnose que assegurem a qualidade da mesma.

2.2 A Estria da Bananeira

A doença denominada “Estria da Bananeira” foi descrita pela primeira vez na Costa do Marfim como 'la mosaïque à tirets' por Yot-Dauthy & Bové (1966), mas somente em 1986 Lockhart descreveu seu agente causal, denominando-o de *Banana streak virus* (BSV). Hoje se sabe que esta doença é causada por várias espécies de vírus pertencentes ao gênero *Badnavirus*.

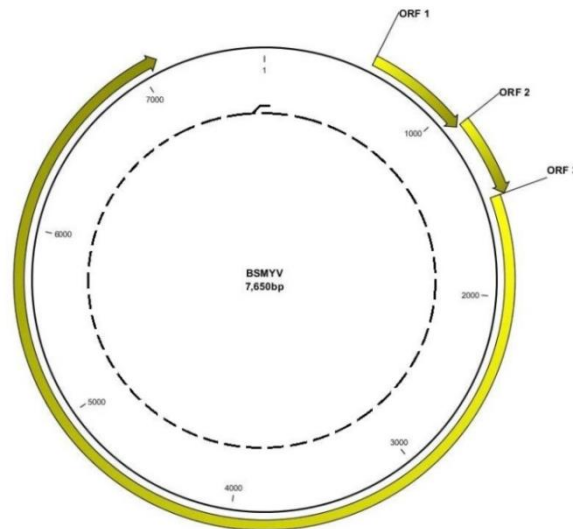
Os sintomas iniciais da estria da bananeira aparecem na lâmina foliar como listras descontínuas, inicialmente cloróticas, mas, com o progresso da infecção, essas estrias necrosam e se tornam marrom-escuro com tonalidades variadas (BRIOSO et al., 2011; SILVEIRA et al., 2008). Pode-se citar como outros sintomas: riscas estreitas e alongadas na face externa do pseudo-pecíolo, lesões foliares cloróticas, mosaico, má formação dos frutos, diminuição do cacho, distorção de folhas e pecíolos, rachaduras no caule e morte do ponto de crescimento (BRIOSO et al., 2011, MEISSNER FILHO et al., 2000, DAHAL et al., 2000). A presença de espécies de *Badnavirus* em bananeira também provoca alterações na absorção e translocação de macronutrientes, levando a uma menor taxa de emissão foliar e redução no peso dos cachos (PEREIRA et al., 2003). Além disso, ocorrem alterações no crescimento e no desenvolvimento das plantas (SILVEIRA et al., 2007). Em alguns casos, folhas recém-emergentes permanecem sem sintomas. Perdas de rendimento de 6 a 90% têm sido observadas, variando de acordo com cultivar, espécies de vírus e condições ambientais (DANIELLS et al., 2001; DAHAL et al., 2000).

2.2.1 Agentes Causais da Estria da Bananeira

As espécies de *Badnavirus* pertencem à família *Caulimoviridae* e possuem partículas baciliformes, não envelopadas, com dimensões de 30 nm x 130 a 150 nm, contendo um genoma circular, de fita dupla de DNA, com 7,4Kb, apresentando 3 ORF's (Open reading frame) (Figura 1). As duas primeiras ORF's codificam pequenas proteínas, com funções ainda não elucidadas, e a terceira e maior ORF codifica uma poliproteína, que após ser clivada gera as proteínas de movimento, capa proteica, aspartil protease, transcriptase reversa (TR) e RNaseH (SHARMA,2015; KING,2011; LOCKHART,1990).

Os *Badnavirus* pertencem ao grupo dos pararetrovírus, ou seja, durante o processo de replicação passam por uma fase em que sintetiza o DNA viral utilizando como molde o RNA (HARPER & HULL, 1998). Isso é possível porque na região intergenica, entre as ORFs, há um sitio de poliadenilação, permitindo a transcrição do genoma completo do vírus em um RNA pré-genômico (pgRNA), que também atua como mRNA. Esse é decodificado no ribossoma para produzir as enzimas necessárias para o processo de replicação e infecção viral e também serve como molde para ser retrotranscrito no genoma viral pela transcriptase reversa codificada pelo vírus (HULL et al, 2005; ROTHNIE et al.,1994).

Figura 1- Organização do genoma do BSMYV.



Nota: O círculo completo representa a dupla fita de DNA de 7650pb. O círculo interno pontilhado mostra o mapeamento dos transcritos. E o outro arco, em amarelo, ilustra a posição das 3 ORF's. Fonte: (ONSARIGO, 2017).

O Comitê internacional de taxonomia de vírus (ICTV-International Committee on Taxonomy of Virus) considera espécies distintas dentro do gênero de Badnavirus, aquelas com uma similaridade menor que 80% na sequência de nucleotídeos do gene que codifica a RT/RNaseH (GEERING AND HULL, 2011), constituída por cerca de 580 pb (YANG et al., 2003). Com base nesse critério, nove espécies já foram reconhecidas, sendo elas: *Banana streak MY vírus* (BSMYV), *Banana streak OL vírus* (BSOLV), *Banana streak GF vírus* (BSGFV), *Banana streak VN vírus* (BSVNV), *Banana streak IM vírus* (BSIMV), *Banana streak UA vírus* (BSUAV), *Banana streak UI vírus* (BSUIV), *Banana streak UL vírus* (BSULV) e *Banana streak UM vírus* (BSUMV) (ICTV, 2019). Com o decorrer do tempo novas espécies tem sido propostas e se encontram aguardando validação pelo ICTV.

Figueiredo et. al. 2006a identificaram quatro possíveis novas espécies de Badnavirus infectando banana no Brasil, em isolados provenientes dos estados do Acre, Amazonas, Bahia, Ceará, Goiás, Minas Gerais, Piauí, Rio de Janeiro, Rondônia, Santa Catarina e São Paulo. Entretanto, não chegaram à sua identificação pelo método aprovado pelo ICTV.

Além da sua grande variabilidade, os *Badnavirus* possuem a capacidade de integrar seu genoma, ou parte dele, no genoma da planta hospedeira. Dois tipos de sequência integrada de *Badnavirus* têm sido identificados em bananeiras: os EPRVs e os eaBSVs. Os EPRVs (*Endogenous Pararetroviral Sequences*) consistem de fragmentos de parte do genoma viral, de modo que são incapazes de causar infecção. Os eaBSVs (sequências endógenas ativas) constituem o genoma completo do vírus, na forma de múltiplas regiões não contínuas do

DNA viral, combinadas com sequências genômicas do hospedeiro, podendo se tornar infectivas sob condições específicas de estresse, como cultura de tecidos, levando à reconstituição e à ativação do genoma viral e resultando em infecções episomais. (JAMES et al, 2011b .; COTÊ et al.,2010; DALLOT et al.,2001; NDOWORA et al.,1999). Os EPRVs são encontrados em bananeiras com genomas A e B, enquanto que os eaBSVs foram detectados apenas em plantas com genoma B (GAYRAL et al., 2008; GEERING et al., 2005a; GEERING et al., 2001).

O mecanismo de integração do genoma viral ao do hospedeiro ainda não foi elucidado. Acredita-se que ocorra por meio de recombinações ilegítimas (GAYRAL & ISKRA-CARUANA, 2009). As sequencias virais podem ser integradas em células germinativas, se incorporando ao genoma, e se expressando por meio de seleção natural e/ou deriva genética (GAYRAL et al., 2010).

A presença das sequencias integradas tem sido consideradas importantes para a planta hospedeira, uma vez que modifica o tamanho e provoca alterações na metilação de seu genoma, atuando como um reorganizador genômico por indução de rearranjos cromossomais. Também foi observado que pequenas porções de EPRVs podem auxiliar na resistência da planta hospedeira ao vírus, através da transcrição de RNA de interferência, silenciando partículas virais não integradas (GAYRAL et al., 2010; HOHN et al., 2008).

Os *Badnavirus* não são transmitidos mecanicamente, entretanto podem ser transmitidos de forma semi-persistente pelas cochonilhas *Planococcus citri* Risso e *Saccharicoccus sacchari* Cockerell, *Planococcus minor* Maskell. Porém, a sua maior disseminação se dá por material propagativo infectado (SILVEIRA et al., 2008). Atualmente a maioria das mudas plantadas no campo tem sido mudas clonais, obtidas através de cultura de tecidos. Entretanto, a intensa subdivisão desse processo causa um estresse capaz de ocasionar a expressão de *Badnavirus* a partir de sequências integradas, ou seja, ativando essas sequencias e promovendo o desenvolvimento da doença (DALLOT et al., 2001).

2.2.2 Métodos de Diagnose da Estria da Bananeira

A variabilidade encontrada dentro do gênero *Badnavirus* e a capacidade de integrar seu genoma, ou parte dele, no genoma da planta formam um entrave para seu teste de diagnose.

O teste sorológico DAS-ELISA (Double Antibody Sandwich- Enzyme Linked Imunossorbent Assay) foi o primeiro a ser utilizado em teste de detecção do BSV. Contudo,

em função da variabilidade genética apresentada pelas espécies que causam a estria da bananeira, os antissoros produzidos não são eficientes para detectar todas as espécies dentro do gênero *Badnavirus*, podendo gerar resultados falso negativos (LHEREUX et al., 2007; FIGUEIREDO et al., 2006a; HARPER et al., 2005; GEERING et al., 2000, 2005b; HARPER & HULL, 1998).

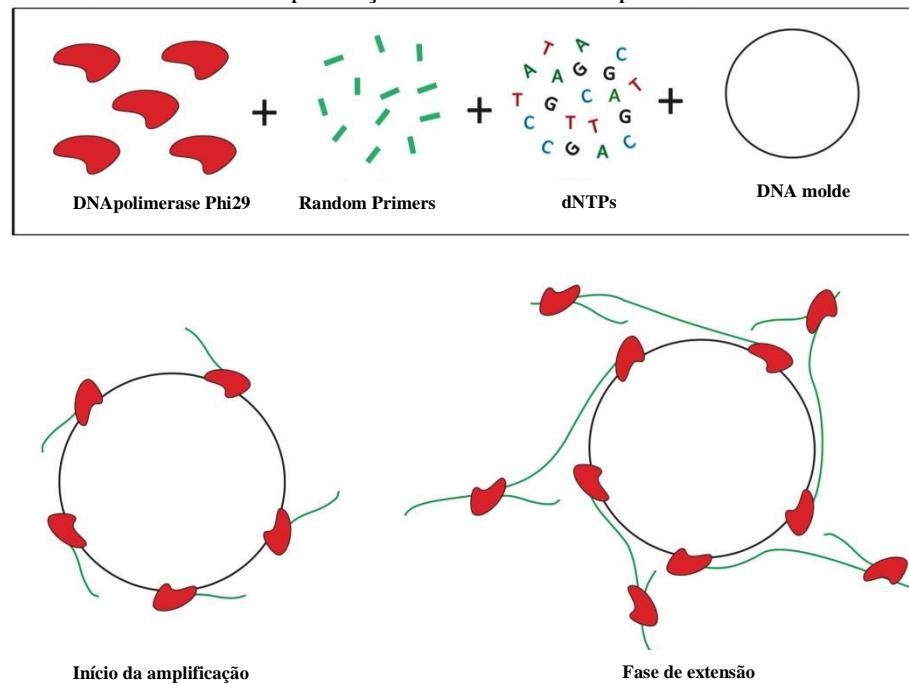
O teste de diagnóstico baseados em PCR, para o gênero *Badnavirus* tem como alvo a região conservada localizada na ORFIII, que codifica a proteína com função RT/RNaseH (YANG et al., 2003; BRAITHWAITE et al., 1995). Entretanto, tais testes não são capazes de discriminar entre os EPRVs e os eaBSVs (JAMES et al., 2011b), de modo que plantas portadoras apenas de EPRVs, podem ser diagnosticadas como positivas, levando ao descarte indevido de plantas sadias (JAMES et al., 2011a; GAYRAL & ISKRA-CARUANA, 2009; LE PROVOST et al., 2006; HARPER et al., 1999).

Uma combinação entre o teste sorológico e o molecular, a técnica o IC-PCR (“Immuno capture PCR”), permite a captura da partícula viral com antissoros específicos para depois realizar o PCR, o que impediria a detecção dos EPRVs (HARPER et al., 1999). Entretanto, apresenta a mesma limitação observada para o teste ELISA, pois não existem antissoros disponíveis para todas as espécies existentes, podendo gerar resultados falso negativos (JAMES et al., 2011b; HARPER et al., 2002).

Devido às limitações nas técnicas de diagnóstico para as espécies de *Badnavirus*, James, 2011a, propôs uma nova técnica denominada “rolling circle amplification” (RCA). Esta técnica usa a DNA polymerase de bacteriófago Phi29, que amplifica moléculas circulares de DNA (figura 2), incluindo plasmídeos (REAGIN et al., 2003; DEAN et al., 2001) e diversos vírus que infectam humanos, animais e plantas (JOHNE et al., 2009). Utilizando-se um conjunto de primers capazes de detectar a maioria das espécies do gênero *Badnavirus*, essa técnica tem potencial para ser empregada com sucesso na sua diagnose, além de diferenciar entre sequência episomal e integrada (JAMES et al., 2011a, 2011b).

Recentemente a técnica RT-PCR também se mostrou eficiente para diagnosticar a presença de *Badnavirus* na forma episomal. Nesta técnica o RNA mensageiro do vírus é detectado na planta infectada, comprovando a infecção (ZHANG et al., 2018; SHAHID et al., 2017; LANEY et al., 2012; LIU et al., 2012). Caso essa técnica possa ser empregada nos testes de rotina, trará uma grande economia nos testes de diagnose, pois os testes RCA apesar de já terem comprovado a sua eficiência, tornam o custo da técnica bastante alto.

Figura 2- Mecanismo de amplificação do DNA circular pela técnica de RCA.



Nota: Primers emparelham-se em múltiplos sites, a DNA polimerase phi29 se estende com maior fidelidade. Com o progresso da reação, o Phi29 se estenderá sobre o DNA sintetizado e amplificará o DNA inúmeras vezes. Adaptado: Evomic Science LLC, 2019.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

3.1.1. Detectar as espécies de *Badnavirus* que ocorrem em diferentes regiões do Brasil e selecionar um método de diagnose que possa ser utilizado na diagnose de rotina em laboratórios oficiais.

3.2 Objetivos Específicos

3.2.1 Coletar amostras de bananeiras com suspeita de infecção por *Badnavirus* nas principais regiões produtoras do Brasil.

3.2.2 Amplificar a região do gene que codifica a RT/RNaseH do vírus por PCR e enviar para sequenciamento, visando determinar as espécies de *Badnavirus* presentes no País.

3.2.3 Testar diferentes métodos de diagnose com a finalidade de encontrar o melhor para ser empregado na rotina dos laboratórios envolvidos na certificação de mudas de bananeira.

4. MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no Laboratório de Virologia Molecular, localizado no Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Lavras.

4.1. Obtenção do Material Vegetal

Os 35 isolados utilizados no presente trabalho foram provenientes de folhas de bananeiras com suspeita de infecção por espécies de *Badnavirus*, provenientes de Minas Gerais, Bahia e Tocantins, com o auxílio de produtores e pesquisadores comprometidos com a produção de banana. Ao chegarem ao Laboratório de Virologia Molecular, parte do tecido vegetal foi submetido à extração de DNA total ou mRNA e o restante acondicionado em freezer -80°C. Como controle negativo, foram utilizadas amostras de bananeiras mantidas em casa de vegetação da UFLA, comprovadamente livre de vírus.

4.2. Extração do DNA Total

O DNA total das plantas foi extraído a partir do tecido foliar, segundo o protocolo de Lodhi et al. (1994). Para a extração 0,15g de tecido vegetal fresco foram macerados na presença de nitrogênio líquido e em seguida foram adicionados 1,5ml de tampão CTAB 2% (100mM Tris-HCL, pH8,0; 20 mM EDTA; 1,4M NaCl; 80 mM Na₂SO₃; 2% PVP-10; e 2 % de Brometo de Cetil-Trimetil-Amônio CTAB) contendo 0,2% de β mercaptoetanol. A mistura foi incubada em banho-maria por 30 minutos e a cada 10 minutos os tubos foram misturados por inversão. Logo após, foi adicionado igual volume do extrato a solução 24:1 clorofórmio e álcool isoamílico, foi dado vórtex para homogeneizar. Os microtubos foram centrifugados a 12.000 rpm por 10 minutos a 4°C e o sobrenadante transferido para novos microtubos. A precipitação do DNA foi realizada com a adição de 0,6 vezes o volume de isopropanol frio (-20°C). A solução foi gentilmente homogeneizada por inversão e armazenada a -20°C por 1 hora. Após a precipitação, foi realizada uma centrifugação de 12000 rpm por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* lavado com 500 µl de álcool 70% a uma centrifugação de 12000 rpm por 1 minuto, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* seco em temperatura ambiente. Em seguida o *pellet* seco foi ressuspenso em 30 µl de água ultra pura com DEPC. A qualidade do DNA extraído foi avaliada por eletroforese em gel de agarose 0,7%.

4.3. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Inicialmente, o DNA proveniente das plantas com suspeita de infecção foi amplificado por PCR, utilizando dois primers específicos o BadnaFP (5' ATGCCITTYGGIITIAARAAYGCICC3') e o BadnaFR (5'CCAYTTRCAIACISCICCCCAICC3'), que amplificam um fragmento de 540 pb referente a região RT/RNaseH, utilizada para diferenciação de espécies (YANG et al., 2003).

O mix da PCR (25µl) foi composto por 2,5µl de 10X Tampão de amostra; 0,75 µl de cada um dos primers Badna FP/RP; 0,75µl MgCl₂; 0,5µl de dNTP; 0,25 µl enzima Taqpolimerase (Ludwig); 1,5µl de DNA e 18 µl água. O ciclo da PCR partiu de uma desnaturação de 95°C durante 2 min, seguido por 35 ciclos de 95°C durante 45 s, 50°C por 1 min e 72°C durante 1 min, com uma extensão final de 72°C durante 5 min. O produto da PCR foi analisado por eletroforese em gel de agarose a 0,7%.

4.4. Rolling Circle Amplification (RCA)

As amostras foram testadas por RCA, empregando-se o Illustra TempliPhi 100 Amplification Kit (GE Healthcare, Buckinghamshire, Reino Unido), seguindo as instruções do fabricante, com pequenas modificações. Inicialmente, 1ul de DNA foi misturado a 5 ul Sample buffer e 2ul de uma solução estoque de 50 µM (de cada primer aproximadamente a 4,16 pmoles/ul) de primers degenerados (Tabela 1). Para a desnaturação do DNA a mistura ficou incubada a 95°C por 5 minutos e foi arrefecida em gelo. Após 5 minutos, adicionou-se 5ul de Reaction Buffer pré misturados a 0,2 ul de polimerase. A reação foi incubada a 30°C por 12 horas, e em seguida para a inativação da enzima 65°C a 10 minutos. O produto obtido foi analisado em gel de agarose 0,7%.

As amostras positivas para RCA foram novamente submetidas à reação de PCR, conforme descrito previamente. Os fragmentos foram purificados utilizando-se o kit de purificação Wizard SVgel and PCR Clean-up System (Promega), seguindo as instruções do fabricante, e enviados para sequenciamento.

Tabela 1- Primers empregados para a amplificação de Badnavirus pela técnica de RCA.

| Primer | Sequência | Referencia |
|---------|---------------------------------|----------------------|
| 1 A | CTNTAYGARTGGYTNGTNGTATGCCNTTYGG | Harper et al. (2002) |
| 4' | TCCAYTTRCANAYNSCNCCCCANCC | Harper et al. (2002) |
| BadnaFP | ATGCCITTYGGIAARAAAYGCICC | Yang et al. (2003) |
| BadnaRP | CCAYTTRCAIACISICCCCAICC | Yang et al. (2003) |
| BSV2292 | ATGARYTAHATWAGRTGYTMSCC | James et al. (2011a) |
| BSV2826 | TYYWGAAARCATGGTGGGRGARGA | James et al. (2011a) |
| BSV3298 | YTCCAYCTTTCRAAKACYTT | James et al. (2011a) |
| BSV3517 | KRATMTTYTWTYTDGAARATCC | James et al. (2011a) |
| BSV3700 | KTGGBAGTTTKGTRAAGARYTC | James et al. (2011a) |
| BSV6652 | GAAAARRTMTGYGCNTAYGCVAG | James et al. (2011a) |
| BSV4030 | TGCARRTGYTWYGCYTG YGGAGA | James et al. (2011a) |

Fonte: Do autor, 2020.

4.5. Sequenciamento e Análise das Sequências

Os fragmentos purificados foram enviados para a Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) para sequenciamento. A análise das sequências obtidas foi realizada utilizando-se o NCBI BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Para o alinhamento das sequências de nucleotídeos e aminoácidos, foi utilizado o programa CLUSTAL W2 (ver. 2.0). Os isolados do GenBank empregados para comparação estão relacionados na Tabela 2, tendo as relações filogenéticas sido estudadas utilizando-se o algoritmo neighbor-joining para aminoácidos e UPGMA para nucleotídeos, empregando-se o bootstrap com 2.000 repetições com o programa MEGA 6.0 (TAMURA et al., 2007).

Os critérios utilizados para identificação de espécies foram os descritos no ICTV.

4.6. Extração de mRNA e RT-PCR

O mRNA das amostras foi extraído e empregado para os testes de diagnose pelo método de RT-PCR. A extração do mRNA foi feita pelo método descrito por Chang et al. (1993). Em um almofariz, 0,1g de tecido vegetal foram macerados na presença de nitrogênio líquido e foram adicionados 500ul de tampão de extração (2% de CTAB; 100mM de Tris-HCl, pH8; 25mM de EDTA, pH8; 2M de NaCl; 0,5g/l de Spermidina; 2% de Beta-mercaptoetanol) pré-aquecido a 65°C. A mistura foi homogeneizada com o pistilo e transferida para microtubos de 1,5 ml. Igual volume de clorofórmio e álcool isoamílico na

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

| Nº DE ACESSO | ESPÉCIE | ACRÔNIMO | PAÍS DE ORIGEM | CITAÇÃO |
|--------------|---|---------------|----------------|-----------------------|
| AJ968427 | <i>Banana streak Obino l'Ewai vírus</i> | BSOLV | Uganda | Harper et al., 2005 |
| HM447634 | <i>Banana streak Obino l'Ewai vírus</i> | BSOLV | Índia | Não publicado |
| KJ013506 | <i>Banana streak Obino l'Ewai vírus</i> | BSOLV | França-clone | Não publicado |
| JF911395 | <i>Banana streak Mysore vírus</i> | BSMyV | Kenya | Não publicado |
| KF724855 | <i>Banana streak Mysore vírus</i> | BSMyV | Índia | Não publicado |
| AB252637 | <i>Banana streak Mysore vírus</i> | BSMyV | Indonésia | Furuya et al., 2012 |
| AJ968464 | <i>Banana streak Uganda C vírus</i> | BSUCV | Uganda | Harper et al., 2005 |
| AJ968465 | <i>Banana streak Uganda D vírus</i> | BSUDV | Uganda | Harper et al., 2005 |
| AJ968470 | <i>Banana streak Uganda G vírus</i> | BSUGV | Uganda | Harper et al., 2005 |
| AJ968471 | <i>Banana streak Uganda G vírus</i> | BSUGV | Uganda | Harper et al., 2005 |
| AJ968443 | <i>Banana streak Goldfinger Virus</i> | BSGFV | Uganda | Harper et al., 2005 |
| JF911405 | <i>Banana streak Goldfinger Virus</i> | BSGFV | Kenya | Não publicado |
| AJ968448 | <i>Banana streak Imove Virus</i> | BSIMV | Uganda | Harper et al., 2005 |
| HQ659760 | <i>Banana streak Imove Virus</i> | BSIMV | Austrália | Geering et al., 2011b |
| KT339354 | <i>Banana streak virus</i> | Isolado DN7-6 | China | Não publicado |
| AJ968500 | <i>Banana streak Uganda I vírus</i> | BSUIV | Uganda | Harper et al., 2005 |
| AJ968474 | <i>Banana streak Uganda I vírus</i> | BSUIV | Uganda | Harper et al., 2005 |
| AJ968525 | <i>Banana streak Uganda L vírus</i> | BSULV | Uganda | Harper et al., 2005 |
| AJ968517 | <i>Banana streak Uganda L vírus</i> | BSULV | Uganda | Harper et al., 2005 |
| AJ968558 | <i>Banana streak Uganda M vírus</i> | BSUMV | Uganda | Harper et al., 2005 |
| AJ968547 | <i>Banana streak Uganda M vírus</i> | BSUMV | Uganda | Harper et al., 2005 |
| AY189414 | Musa AAB | seq. endógena | Austrália | Geering et al., 2005b |
| KT339363 | Banana streak virus | Isolado XL-3 | China | Não publicado |

Fonte: Do autor, 2020.

proporção 24:1 foram adicionados à mistura, foi dado vórtex para homogeneizar e os microtubos foram centrifugados a 12.000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi coletado e transferido para novos microtubos, foi novamente adicionado o mesmo volume de clorofórmio e álcool isoamílico na proporção 24:1, foi dado vórtex e os tubos foram centrifugados a 12.000 rpm por 10 minutos. A fase superior foi coletada e transferida para novos tubos. Para a precipitação do RNA foi adicionado ¼ do volume de cloreto de lítio a 10M. A mistura ficou em geladeira (4°C) overnight e após foi centrifugada a 12.000 rpm por 10 minutos. O *pellet* foi dissolvido em SSTE (1M NaCl, 0,5%SDS, 10mM Tris-HCl pH8, 1mMEDTA pH8), logo em seguida foi adicionado o mesmo volume de clorofórmio e álcool isoamilico e foi dado vórtex . A mistura foi levada a centrifuga por 10 minutos a 12.000rpm e o sobrenadante foi transferido para novos tubos. Duas vezes o volume de etanol foi adicionado a mistura. Os tubos foram mantidos a -20°C por 2horas para que ocorresse a precipitação. Após, os tubos foram levado a centrifugada por 20 minutos. O *pellet* foi lavado

com 500ul de etanol 75%. . O *pellet* foi seco em temperatura ambiente e ressuspendido em 30 ul de água com DEPC. A qualidade do RNA extraído foi avaliada por eletroforese em gel de agarose 0,7%.

Para a eliminação do DNA residual, os RNA's foram tratados com DNase, do seguinte modo, em um microtubo foi adicionado a 4ul de RNA, 0,5 ul de 10x Reaction Buffer com MgCl₂ e 0,5ul de DNaseI (Fermentas), a mistura ficou incubada por 30 minutos a 37°C. Após foi adicionado 1ul de EDTA e a mistura foi incubada a 65°C por 10 minutos. A eficiência do processo foi observada em gel de agarose 0,7%.

Na RT-PCR, sintetizou-se a cadeia de DNA complementar ao mRNA extraído da planta infectada, utilizando a enzima MMLV da Ludwig e o primer oligo dT. O mix da reação foi composto de 2,5 ul de mRNA, 1ul de dNTP , 1ul de primer Oligo dT e 10,7 ul de água ultra pura com DEPC que foi inicialmente aquecido a 70°C por 5 minutos, e depois foi arrefecido em gelo. A mistura foi adicionado 0,8 ul de MMLV RT e 4ul de 5X RT Buffer e então foi levado ao termociclador a 42°C por 1 hora e posteriormente 10 minutos a 70°C para a inativação da enzima. O cDNA obtido foi amplificado utilizando os primers Badna-FP / RP (Yang et al., 2003) conforme descrito anteriormente.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Métodos de Diagnose

Foram indexadas 35 amostras de bananeiras pelas técnicas PCR, RCA e RT-PCR (Tabela 3). Dentre as amostras analisadas, nove foram negativas no PCR e cinco amostras, apesar de terem sido positivas por PCR, foram negativas nas técnicas RCA e RT-PCR, mostrando que o PCR detectou fragmentos do genoma viral integrados no genoma da planta hospedeira (EPRVs) incapazes de infectá-la. Isso mostra que o emprego apenas da técnica de PCR para diagnose de espécies de *Badnavirus* pode levar ao descarte indevido de material para propagação, levando a prejuízos desnecessários. As vinte e uma restantes foram positivas nas três técnicas, indicando a presença da infecção epissomal por espécies de *Badnavirus*, ou seja, a presença do vírus em atividade.

As técnicas RCA e RT-PCR têm sido utilizadas para detectar a presença de *Badnavirus*, uma vez que detectam apenas sequencias epissomais, evitando o descarte indevido de amostras com EPRV's, que apresentam resultado positivo na PCR (Figura 3).

Tabela 3-Relação dos isolados submetidos aos testes de diagnose por PCR, RCA e RT-PCR, com as respectivas origens e resultados obtidos.

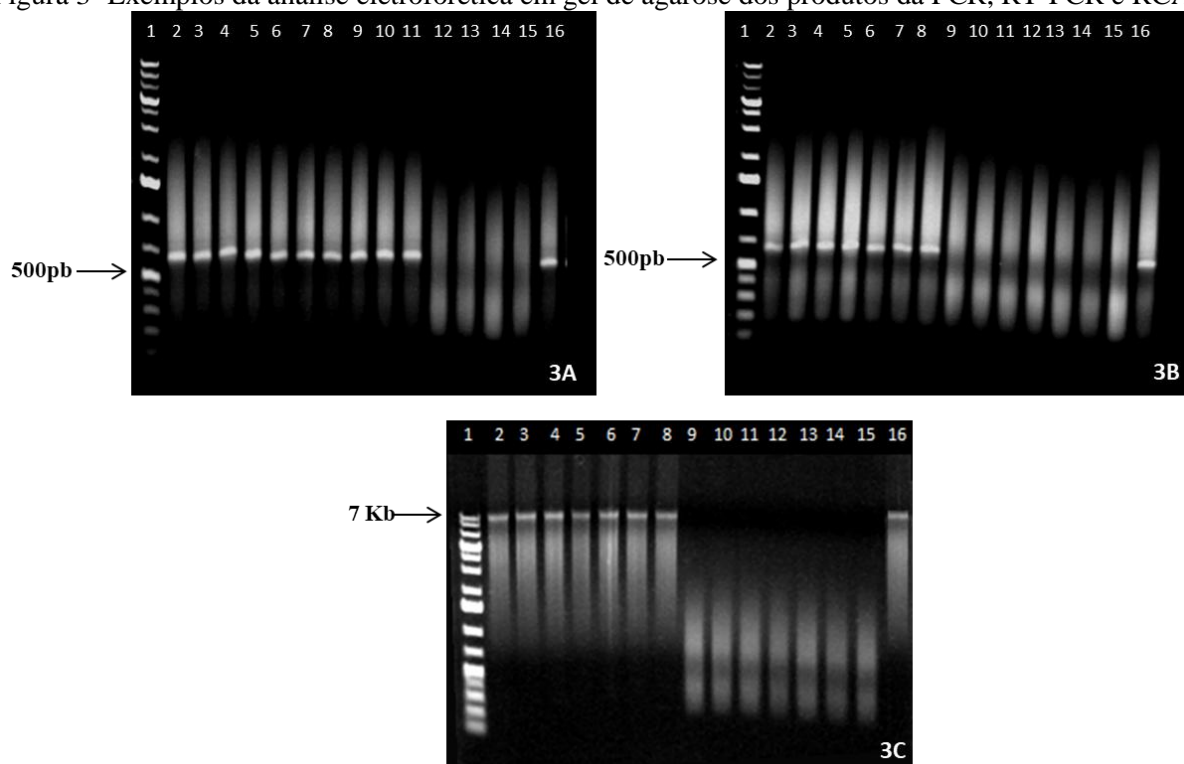
| N° da amostra | Denominação do Isolado | Genótipo | Cultivar | Local | Resultado Diagnose | | |
|---------------|------------------------|----------|----------------------|--------------------|--------------------|-----|--------|
| | | | | | PCR | RCA | RT-PCR |
| 1 | MG-PHIA | AAAB | Phia | Lavras-MG | + | + | + |
| 2 | MG-CAV | AAA | Caru Verde | Viçosa- MG | + | + | + |
| 3 | MG-OC | AA | Ouro de Colatina | Viçosa- MG | + | + | + |
| 4 | MG-CAJU | ND | Caju | Viçosa- MG | + | + | + |
| 5 | MG-CAR | AAB | Caru Roxo | Viçosa- MG | + | + | + |
| 6 | MG-MA3 | AAA | Maçã | Viçosa- MG | + | + | + |
| 7 | MG- TERRI | AAB | Terrinha | Viçosa- MG | + | + | + |
| 8 | MG-MAR | AAB | Maçã Roxa | Viçosa- MG | + | + | + |
| 9 | MG-NAN | AAA | Nanica | Viçosa- MG | + | + | + |
| 10 | BA-BRP | ABB | BRS Pelipita | Cruz das Almas-BA | + | + | + |
| 11 | BA-WIL | AAA | Williams | Cruz das Almas-BA | + | + | + |
| 12 | MG-PRGO1 | AAB | Prata Gorutuba | Andradas- MG | + | + | + |
| 13 | MG-PRCA | AAB | Prata Catarina | Andradas- MG | + | + | + |
| 14 | MG-PRGO2 | AAB | Prata Gorutuba | Andradas- MG | + | + | + |
| 15 | MG-MA4 | AAA | Maçã | Andradas- MG | + | + | + |
| 16 | MG-PR2 | AAB | Prata | Janaúba- MG | + | + | + |
| 17 | MG-OM | AA | Ouro Mata | Viçosa- MG | + | + | + |
| 18 | MG- SEM | ND | Semente | Viçosa- MG | + | + | + |
| 19 | TO-NAN | AAB | Mysore | TOCANTINS | + | + | + |
| 20 | MG-WIL1 | AAA | Williams | Andradas –MG | + | + | + |
| 21 | MG-WIL2 | AAA | Williams | Andradas –MG | + | + | + |
| 22 | BA-PR | AAB | BRS Garantida/ Prata | Cruz das Almas- BA | - | - | - |
| 23 | BA-MA | AAB | Maça | Cruz das Almas- BA | - | - | - |
| 24 | BA-PRA | AAB | Prata Anã | Cruz das Almas- BA | - | - | - |
| 25 | MG- GRN3 | AAA | Grande Naine | Andradas – MG | - | - | - |
| 26 | MG-MAP | AAB | BRS Princesa / Maça | Andradas – MG | - | - | - |
| 27 | MG-PR | AAB | Prata | Janaúba –MG | - | - | - |
| 28 | MG-NAN1 | AAA | Nanica | Janaúba –MG | - | - | - |
| 29 | MG-SH | AAB | SH-3640/ Prata Anã | Viçosa- MG | - | - | - |
| 30 | MG-PA | AAB | Pacovã | Viçosa- MG | - | - | - |
| 31 | MG-GRN1 | AAA | Grande Naine | Andradas – MG | + | - | - |
| 32 | MG-WIL3 | AAA | Willians | Andradas – MG | + | - | - |
| 33 | MG- PRCA1 | AAB | SCS451 Catarina | Andradas – MG | + | - | - |
| 34 | MG- GRN3 | AAA | Grande Naine | Andradas – MG | + | - | - |
| 35 | MG-PRA | AAB | Prata anã | Andradas – MG | + | - | - |

Fonte: Do autor, 2020.

As duas técnicas se baseiam em princípios diferentes, enquanto o RCA detecta o DNA viral em sua forma circular, a RT-PCR detecta o RNA mensageiro que é formado quando o vírus está em atividade. Assim sendo, as duas tecnologias provaram ser capazes de detectar com eficiência a presença do vírus em sua forma ativa (SUKAL et al., 2019; ZHANG et al., 2018; SHAHID et al., 2017; LANEY et al., 2012; LIU et al.,2012; WAMBULWA et al.,

2012; JAMES et al., 2011a). Entretanto a técnica de RCA é muito onerosa, o que torna a técnica de RT-PCR custo-efetiva, ideal para ser empregada nas rotinas dos laboratórios oficiais de diagnose.

Figura 3- Exemplos da análise eletroforética em gel de agarose dos produtos da PCR, RT-PCR e RCA.



Nota: A- produtos da PCR, B- produtos da RT-PCR; C- produtos do RCA. 1-Marcador 1Kb; 2- MG-PHIA; 3-MG-CAV; 4-MG-OC; 5- MG-CAJU; 6- MG-MA3, 7- MG-TERRI; 8-MG-MAR; 9- MG-GRN1; 10- MG-WILL3; 11- MG-PRCA1,12- BA-PR;13-BA-MA; 14-BA-PRA; 15-controle negativo; 16- controle positivo.

5.2. Análise Filogenética

Um fragmento com 540 pb correspondente à região codificadora da RT/RNaseH, dos 21 isolados que foram positivos nas três técnicas, foi amplificado com o par de primers BadnaFP e BadnaRP (YANG,et al., 2003), sequenciado e analisado. Com base na análise das sequências e seguindo os critérios do ICTV, que estabelece um mínimo de 80%, de identidade dos nucleotídeos para que as espécies sejam consideradas iguais, os isolados brasileiros se dividiram em seis possíveis espécies. O Primeiro isolado denominado MG-PHIA não se agrupou com nenhum dos demais 20 isolados, apresentando uma identidade que variou entre 65 e 72% quando a sua sequência de nucleotídeos foi comparada com as demais (Tabela 4). O

mesmo aconteceu com o TO-NAN, cuja identidade de nucleotídeos variou entre 66% e 70% com os demais isolados brasileiros. O isolado MG-OC e o MG-CAJU apresentaram uma identidade de nucleotídeos entre si de 87%, enquanto que os isolados MG-TERRI, BA-BRP e MG-SEM apresentaram identidades de nucleotídeos entre 90 e 95% entre eles, indicando pertencerem à mesma espécie.

As duas espécies com maior número de isolados foi a constituída pelos isolados MG-CAV, MG-MA4, MG-PRCA, MG-PRGO2, MG-PR2, MG-OM, MG-WIL 1 e MG-WIL2 com identidades de nucleotídeos entre 80 e 93 % e a constituída pelos isolados MG-CAR, MG-MA3, MG-MAR, MG-NAN, BA-WIL, MG-PRGO1, com identidades entre 88 e 96%. Apesar de o isolado MG-PRGO1 ter também apresentado uma identidade de 80% com o isolado MG-WIL1, apresentou identidades bem maiores com os demais isolados dessa última espécie (88 a 92%), motivo pelo qual se decidiu esperar até a comparação com os demais isolados do GenBank, para conclusão definitiva.

Quando comparados com os isolados do GenBank pertencentes às diferentes espécies já relatadas, reconhecidas ou não pelo ICTV, as identidades variaram entre 61% e 99%. Como observado na identidade entre os isolados brasileiros, quando comparados com as espécies já descritas os isolados mantiveram o mesmo comportamento anterior, ou seja, foram identificadas seis espécies de *Badnavirus* (Tabela 5).

O isolado MG-PHIA, não apresentou identidade igual ou superior a 80% com nenhum dos isolados já descritos e disponíveis no GenBank, mas já havia sido encontrado anteriormente no Brasil, motivo pelo qual foi tentativamente denominado de Banana *streak Brazilian A vírus* (BSBrAV). Observou-se novamente, que esse isolado apresenta uma alta identidade de nucleotídeos (99%) com o uma sequência endógena AY189414 detectada por Geering et al. (2005b) há mais de uma década na Austrália. A partir de então, nenhuma sequência epissomal havia sido descrita de modo que esse vírus permaneceu desconhecido até recentemente quando foi detectado pela primeira vez por ALVES (2013).

Tabela 5. Relação das espécies de *Badnavirus* encontradas entre os isolados brasileiros, associados ao aparecimento de estrias em bananeira, que foram sequenciados e classificados com base nos critérios do ICTV.

| Espécie de Badnavírus | Acrônimo | Isolados e Estado de Origem |
|---|-----------------|---|
| <i>Banana streak Brazilian A vírus</i> | BSBrAV | MG-PHIA |
| <i>Banana streak Mysore vírus</i> | BSMyV | TO-NAN |
| <i>Banana streak Obino l'Ewai vírus</i> | BSOLV | MG-OC, MG-CAJU |
| <i>Banana streak Uganda C vírus</i> | BSUCV | MG-CAV, MG-MA4, MG-PRCA, MG-PRGO2, MG-PR2, MG-OM, MG-WIL1 e MG-WIL2 |
| <i>Banana streak Uganda D vírus</i> | BSUDV | MG-CAR, MG-MA3, MG-MAR, MG-NAN, BA-WIL e MG-PRGO1 |
| <i>Banana streak Uganda G vírus</i> | BSUGV | MG- TERRI, MG- SEM, BA-BRP |

Fonte: Do autor, 2020.

O isolado TO-NAN apresentou identidade de 90% com os três isolados de *Banana streak mysore vírus* (BSMyV), da Índia (KF724855), de Kenya (JF911395) e da Indonésia (AB252637). Analisando-se os genomas disponíveis no GenBank, essa espécie parece ser uma das que apresenta maior estabilidade nessa região do genoma. Os isolados MG-OC e MG-CAJU apresentaram identidades de nucleotídeos entre 81% e 86% com os isolados de *Banana streak Obino l'Ewai vírus*(BSOLV), provenientes da Índia (HM447634), França (KJ013506) e Uganda (AJ968427).

A maioria dos isolados (MG-CAV, MG-MA4, MG-PRCA, MG-PRGO2, MG-PR2, MG-OM, MG-WIL1 e MG-WIL2) apresentou identidades entre 83% e 93% com o isolado AJ968464 da Uganda, pertencente à espécie ainda não reconhecida pelo ICTV, *Banana streak Uganda C vírus*. O isolado MG-WIL 1 apresentou uma identidade de 89% com esse isolado, enquanto que a identidade de nucleotídeos entre o MG-PRGO1 e o isolado foi de 75%.

Outros seis isolados (MG-CAR, MG-MA3, MG-MAR, MG-NAN, BA-WIL e MG-PRGO1) apresentaram identidades entre 90 e 94% com o isolado AJ968465 da Uganda, pertencente à espécie *Banana streak Uganda D vírus* (BSUDV). Portanto, apesar de o MG-PRGO1 ter mostrado uma identidade de nucleotídeos de 80% com o MG-WIL1, classificado como BSUCV, a sua identidade com a BSUDV foi de 94%, mostrando que realmente são espécies distintas. Esses isolados classificados como BSUDV apresentaram também identidades entre 85% e 91% com o isolado XL-3 (KT339363) da China, que não especificou a espécie, mas, provavelmente deve ser BSUDV.

Os três isolados restantes, MG- TERRI, MG- SEM, BA-BRP mostraram identidade de nucleotídeos entre 83% e 86% com os isolados AJ968470 e AJ968471 da Uganda,

pertencente à espécie *Banana streak Uganda G vírus* (BSUGV). Do mesmo modo que os isolados anteriores, esses três isolados apresentaram identidades entre 92% e 98% com o isolado DN7-6 da China, cuja identidade não foi mencionada, mas provavelmente também deve ser da espécie BSUGV.

As espécies BSMYV, BSOLV e o isolado MG-PHIA mostraram uma demarcação bastante clara entre as espécies, não apresentando identidades igual ou maior que 80% com nenhum isolado fora da sua espécie. Nenhum dos isolados sequenciados apresentou identidade igual ou superior a 80% com os isolados do GenBank pertencentes às espécies *Banana streak Goldfinger Virus* (BSGFV), *Banana streak Imove Virus* (BSIMV), *Banana streak Uganda I vírus* (BSUIV), *Banana streak Uganda L vírus* (BSULV) e *Banana streak Uganda M vírus* (BSUMV). Apesar de não estar aqui relacionado, também não atingiram os 80% de identidade quando foram comparados com a espécie *Banana streak Uganda A vírus* (BSUAV).

A identidade observada entre a sequência de aminoácidos foi notadamente maior, não apenas intraespécie como entre algumas espécies (tabela 6). Os isolados sequenciados das espécies BSOLV e BSMYV mostraram uma demarcação bastante clara entre as espécies, ambas apresentando identidades de aminoácidos entre 56% e 78% com as espécies com as quais foram comparadas. O isolado MG-PHIA também mostrou uma clara diferenciação das demais espécies, com uma identidade de 80% com os isolados BSOLV e identidades entre 63% e 76% com as demais espécies com as quais foi comparada. Entretanto, a sua identidade com a sequência endógena da bananeira (AY189414), já referenciada anteriormente, foi de 98%. As demais, apesar de apresentarem uma tendência de mostrar maiores identidades com os isolados da mesma espécie, mostraram também identidades às vezes de até 86% entre isolados de diferentes espécies.

Como o critério estabelecido pelo ICTV é baseado na sequência de nucleotídeos, e não na de aminoácidos, essas identidades não mudam a classificação já estabelecida para os 21 isolados. Essa baixa variabilidade de nucleotídeos e aminoácidos entre as espécies da Uganda, como essas que encontramos (C, D e G) já foi levantada por outros autores (HOLLANDA FERREIRA et al. 2019; RAO et al., 2020). Analisando as sequências das espécies que estão disponíveis no GenBank, Hollanda Ferreira et al., 2019, destacaram a fragilidade dessa classificação com base na região da RT/RNase H, sugerindo que talvez o melhor fosse aumentar o nível de identidade para valores acima de 82,5% ou mesmo basear a classificação no genoma completo do vírus. RAO et al. (2020), analisando o genoma

Tabela 6. Porcentagem (%) de identidade entre as sequências de aminoácidos da região codificadora RT/RNaseH dos isolados do Brasil com GenBank.

| Nº | Isolados | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 | 21 | 22 | 23 | 24 | 25 | 26 | 27 | 28 | 29 | 30 | 31 | 32 | 33 | 34 | 35 | 36 | 37 | 38 | 39 | 40 | 41 | 42 | 43 | 44 |
|----|-----------|--------------|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|-----|-----|-----|----|----|----|-----|----|----|----|----|----|-----|----|----|----|----|----|----|----|----|
| 1 | MG-PHIA | - | 63 | 74 | 78 | 68 | 67 | 70 | 68 | 67 | 68 | 65 | 69 | 69 | 67 | 70 | 62 | 68 | 69 | 70 | 69 | 65 | 80 | 80 | 80 | 72 | 72 | 72 | 65 | 69 | 67 | 67 | 71 | 71 | 76 | 76 | 69 | 63 | 65 | 64 | 63 | 66 | 65 | 98 | 70 |
| 2 | MG-CAV | | - | 60 | 63 | 81 | 78 | 85 | 74 | 77 | 78 | 70 | 78 | 77 | 89 | 88 | 78 | 85 | 75 | 64 | 86 | 76 | 65 | 65 | 65 | 63 | 63 | 63 | 91 | 77 | 73 | 73 | 61 | 61 | 65 | 65 | 75 | 56 | 57 | 57 | 57 | 60 | 60 | 63 | 77 |
| 3 | MG-OC | | | - | 87 | 63 | 65 | 63 | 64 | 63 | 65 | 62 | 66 | 65 | 63 | 64 | 56 | 65 | 66 | 63 | 63 | 63 | 86 | 85 | 86 | 68 | 68 | 68 | 60 | 66 | 61 | 61 | 65 | 65 | 71 | 70 | 66 | 56 | 57 | 56 | 57 | 56 | 56 | 75 | 67 |
| 4 | MG-CAJU | | | | - | 65 | 67 | 67 | 67 | 67 | 67 | 64 | 69 | 67 | 67 | 67 | 61 | 67 | 68 | 67 | 68 | 66 | 88 | 88 | 88 | 70 | 70 | 70 | 63 | 68 | 63 | 63 | 69 | 70 | 75 | 74 | 68 | 61 | 62 | 59 | 59 | 60 | 60 | 78 | 69 |
| 5 | MG-CAR | | | | | - | 95 | 86 | 81 | 92 | 95 | 78 | 95 | 95 | 83 | 85 | 78 | 86 | 82 | 73 | 86 | 82 | 67 | 67 | 68 | 71 | 71 | 71 | 81 | 96 | 82 | 82 | 65 | 65 | 69 | 69 | 82 | 63 | 63 | 64 | 63 | 65 | 65 | 68 | 91 |
| 6 | MG-MA3 | | | | | | - | 84 | 81 | 92 | 98 | 76 | 95 | 96 | 81 | 84 | 75 | 85 | 82 | 73 | 83 | 80 | 68 | 68 | 69 | 72 | 72 | 72 | 78 | 97 | 81 | 81 | 63 | 64 | 70 | 70 | 82 | 62 | 62 | 62 | 62 | 62 | 62 | 67 | 95 |
| 7 | MG-MA4 | | | | | | | - | 80 | 82 | 84 | 76 | 84 | 83 | 90 | 91 | 85 | 91 | 81 | 69 | 92 | 83 | 67 | 67 | 68 | 69 | 69 | 69 | 89 | 83 | 80 | 80 | 67 | 67 | 70 | 70 | 81 | 62 | 63 | 60 | 61 | 64 | 64 | 69 | 83 |
| 8 | MG-TERRI | | | | | | | | - | 81 | 82 | 89 | 83 | 82 | 78 | 78 | 72 | 80 | 95 | 67 | 80 | 79 | 68 | 68 | 68 | 66 | 66 | 66 | 74 | 82 | 91 | 91 | 62 | 63 | 70 | 69 | 95 | 60 | 60 | 58 | 57 | 58 | 58 | 68 | 82 |
| 9 | MG-MAR | | | | | | | | | - | 92 | 76 | 94 | 92 | 81 | 81 | 75 | 84 | 80 | 71 | 83 | 78 | 66 | 66 | 67 | 70 | 70 | 70 | 78 | 95 | 80 | 80 | 61 | 61 | 68 | 68 | 80 | 60 | 60 | 62 | 61 | 61 | 61 | 66 | 91 |
| 10 | MG-NAN | | | | | | | | | | - | 77 | 95 | 96 | 81 | 84 | 76 | 86 | 83 | 72 | 83 | 81 | 70 | 70 | 71 | 71 | 71 | 71 | 78 | 97 | 82 | 82 | 65 | 65 | 71 | 71 | 83 | 62 | 63 | 62 | 62 | 63 | 63 | 68 | 95 |
| 11 | BA-BRP | | | | | | | | | | | - | 78 | 78 | 79 | 76 | 70 | 77 | 93 | 65 | 75 | 75 | 65 | 65 | 65 | 63 | 63 | 63 | 70 | 78 | 88 | 88 | 61 | 60 | 66 | 66 | 93 | 57 | 57 | 57 | 56 | 56 | 57 | 65 | 78 |
| 12 | BA-WIL | | | | | | | | | | | | - | 95 | 82 | 82 | 77 | 86 | 83 | 72 | 84 | 85 | 69 | 69 | 70 | 71 | 71 | 71 | 78 | 98 | 82 | 82 | 63 | 64 | 70 | 70 | 83 | 61 | 62 | 62 | 61 | 61 | 61 | 68 | 95 |
| 13 | MG-PRGO1 | | | | | | | | | | | | | - | 81 | 82 | 76 | 85 | 83 | 72 | 83 | 81 | 68 | 68 | 69 | 71 | 71 | 71 | 77 | 97 | 83 | 83 | 65 | 65 | 70 | 70 | 83 | 68 | 62 | 63 | 62 | 63 | 63 | 68 | 95 |
| 14 | MG-PRCA | | | | | | | | | | | | | | - | 92 | 81 | 87 | 78 | 67 | 89 | 80 | 66 | 66 | 67 | 67 | 67 | 67 | 92 | 81 | 77 | 77 | 63 | 63 | 68 | 68 | 78 | 59 | 60 | 58 | 58 | 61 | 61 | 67 | 81 |
| 15 | MG-PRGO2 | | | | | | | | | | | | | | | - | 82 | 91 | 80 | 69 | 91 | 83 | 68 | 68 | 68 | 68 | 68 | 68 | 92 | 82 | 78 | 78 | 65 | 65 | 71 | 71 | 80 | 61 | 62 | 63 | 60 | 62 | 62 | 69 | 83 |
| 16 | MG-PR2 | | | | | | | | | | | | | | | | - | 83 | 73 | 63 | 82 | 76 | 60 | 60 | 61 | 62 | 62 | 62 | 82 | 76 | 71 | 71 | 58 | 58 | 63 | 63 | 73 | 56 | 57 | 56 | 55 | 58 | 58 | 61 | 76 |
| 17 | MG-OM | | | | | | | | | | | | | | | | | - | 81 | 70 | 91 | 84 | 68 | 68 | 69 | 68 | 68 | 68 | 89 | 85 | 79 | 79 | 65 | 65 | 69 | 69 | 81 | 62 | 62 | 61 | 61 | 65 | 65 | 68 | 85 |
| 18 | MG-SEM | | | | | | | | | | | | | | | | | | - | 68 | 80 | 80 | 71 | 71 | 71 | 66 | 66 | 66 | 75 | 83 | 92 | 92 | 63 | 64 | 71 | 71 | 100 | 60 | 61 | 60 | 59 | 60 | 60 | 68 | 83 |
| 19 | TO-NAN | | | | | | | | | | | | | | | | | | | - | 70 | 68 | 69 | 70 | 70 | 85 | 85 | 85 | 65 | 73 | 66 | 66 | 63 | 63 | 70 | 70 | 68 | 61 | 61 | 61 | 61 | 60 | 60 | 70 | 73 |
| 20 | MG-WIL 1 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | - | 87 | 68 | 68 | 68 | 70 | 70 | 70 | 90 | 83 | 80 | 80 | 65 | 65 | 71 | 71 | 80 | 62 | 62 | 60 | 61 | 65 | 66 | 68 | 83 | |
| 21 | MG-WIL2 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | - | 67 | 67 | 68 | 67 | 67 | 67 | 81 | 80 | 78 | 78 | 63 | 63 | 70 | 70 | 80 | 61 | 61 | 61 | 60 | 63 | 63 | 65 | 80 | |
| 22 | A.J968427 | BSOLV | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | - | 98 | 98 | 75 | 75 | 75 | 64 | 70 | 66 | 66 | 71 | 72 | 80 | 80 | 71 | 61 | 62 | 61 | 61 | 62 | 62 | 81 | 70 | |
| 23 | HM447634 | BSOLV | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | - | 99 | 75 | 75 | 75 | 64 | 70 | 66 | 66 | 71 | 71 | 80 | 79 | 71 | 62 | 62 | 61 | 61 | 62 | 62 | 80 | 70 | |
| 24 | KJ013506 | BSOLV | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | - | 75 | 75 | 75 | 65 | 70 | 66 | 66 | 71 | 72 | 80 | 80 | 71 | 62 | 62 | 62 | 62 | 63 | 62 | 81 | 71 | |
| 25 | JF911395 | BSMyV | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | - | 100 | 100 | 64 | 72 | 64 | 64 | 65 | 65 | 73 | 73 | 66 | 62 | 62 | 63 | 62 | 62 | 62 | 62 | 73 | 72 | |
| 26 | AB252637 | BSMyV | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | - | 100 | 64 | 72 | 64 | 64 | 65 | 65 | 73 | 73 | 66 | 62 | 62 | 63 | 62 | 62 | 62 | 62 | 73 | 72 | |
| 27 | KF724855 | BSMyV | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | - | 100 | 64 | 72 | 64 | 64 | 65 | 65 | 73 | 73 | 66 | 62 | 62 | 63 | 62 | 62 | 62 | 73 | 72 | |
| 28 | A.J968464 | BSUCV | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | - | 64 | 72 | 64 | 64 | 65 | 65 | 73 | 73 | 66 | 62 | 62 | 63 | 62 | 62 | 62 | 73 | 72 | |
| 29 | A.J968465 | BSUDV | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | - | 77 | 75 | 75 | 63 | 63 | 66 | 66 | 75 | 57 | 58 | 57 | 58 | 61 | 61 | 64 | 77 | |
| 30 | A.J968471 | BSUGV | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | - | 82 | 82 | 64 | 65 | 71 | 71 | 83 | 61 | 62 | 62 | 61 | 62 | 62 | 68 | 95 | |
| 31 | A.J968470 | BSUGV | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | - | 100 | 63 | 62 | 68 | 68 | 92 | 58 | 58 | 57 | 56 | 57 | 57 | 66 | 82 | |
| 32 | JF911405 | BSGFV | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | - | 63 | 62 | 68 | 68 | 92 | 58 | 58 | 57 | 56 | 57 | 57 | 66 | 82 | | |
| 33 | A.J968443 | BSGFV | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | - | 98 | 71 | 71 | 63 | 60 | 61 | 60 | 59 | 63 | 63 | 71 | 65 | | |
| 34 | A.J968448 | BSIMV | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | - | 71 | 71 | 64 | 60 | 61 | 61 | 60 | 63 | 63 | 71 | 65 | | | |
| 35 | HQ659760 | BSIMV | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | - | 99 | 71 | 61 | 62 | 62 | 61 | 63 | 62 | 77 | 72 | | | | |
| 36 | KT339354 | DN7-6 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | - | 71 | 61 | 62 | 62 | 61 | 63 | 62 | 76 | 72 | | | | | |
| 37 | A.J968500 | BSUIV | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | - | 60 | 61 | 60 | 59 | 60 | 60 | 68 | 83 | | | | | | |
| 38 | A.J968474 | BSUIV | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | - | 96 | 83 | 82 | 83 | 85 | 63 | 62 | | | | | | |
| 39 | A.J968525 | BSULV | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | - | 83 | 82 | 83 | 85 | 64 | 63 | | | | | | | |
| 40 | A.J968517 | BSULV | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | - | 93 | 85 | 85 | 63 | 63 | | | | | | | | |
| 41 | A.J968558 | BSUMV | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | - | 83 | 83 | 63 | 62 | | | | | | | | | |
| 42 | A.J968547 | BSUMV | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | - | 98 | 65 | 62 | | | | | | | | | | |
| 43 | AY189414 | Seq.Endógena | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | - | 65 | 62 | | | | | | | | | | | |
| 44 | KT339363 | XL-3 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | - | 69 | | | | | | | | | | | | |

Fonte: Do autor,2020.

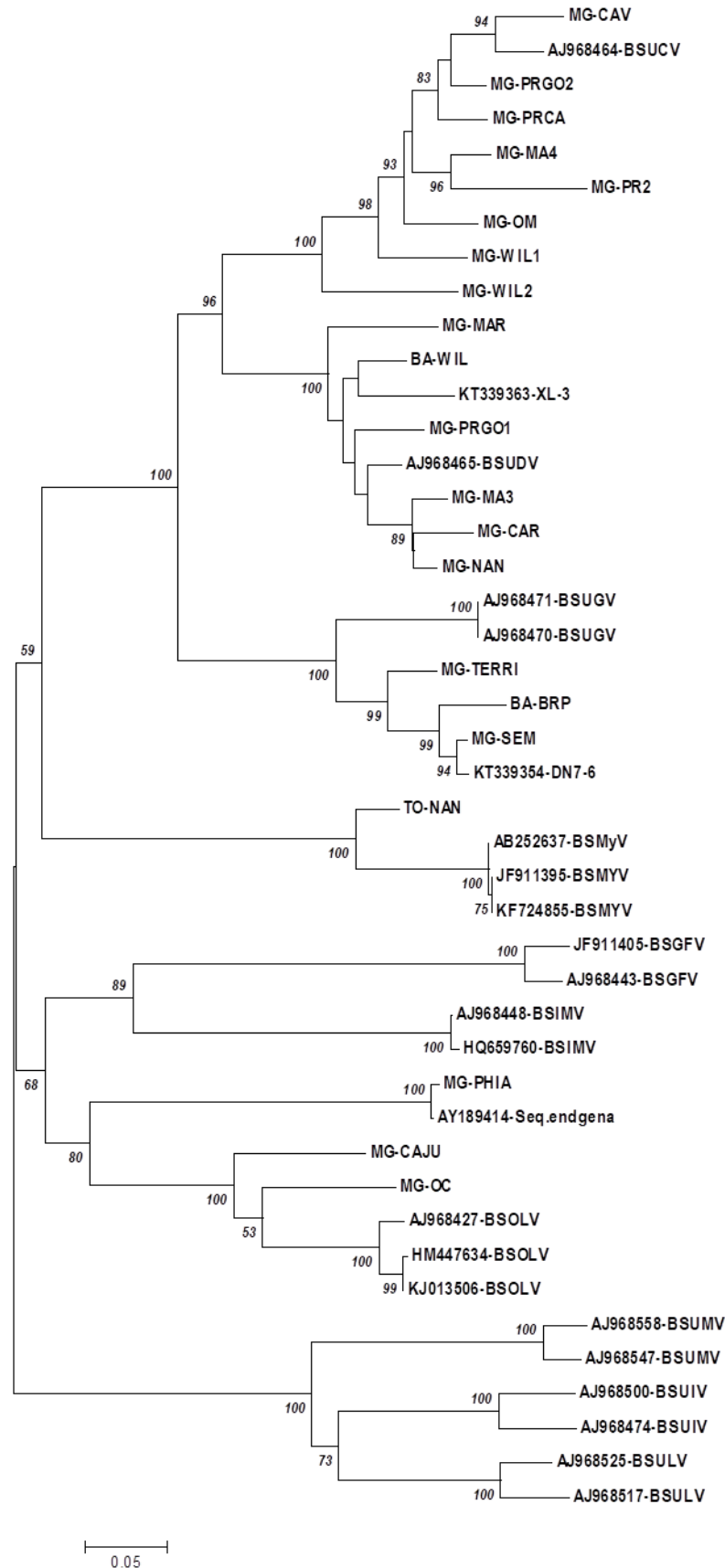
de um isolado de badnavirus encontrado na China, observaram que ele apresentou identidades de nucleotídeos acima de 80% nessa região com mais de uma espécie. Mas, ao sequenciar o genoma completo, chegaram à conclusão de que se tratava de um novo vírus ainda não descrito, ao qual denominaram de *Sugarcane baciliform guadeloupe A vírus-2* (SCBGAV-2). Os autores também sugeriram que talvez o critério para demarcação entre as espécies dos badnavirus deva ser mudado.

O grande número de espécies descritas, causando estrias em bananeira, deve-se ao fato de serem pararetrovirus. Transcriptases reversas são conhecidas por produzirem erros em retrovírus e retroelementos, de modo que essa falta de atividade de revisão pode ter contribuído para as altas taxas de mutação observadas para esses vírus (BOUSALEM, DOUZERY & SEAL, 2008; SVAROVSKAIA et al., 2003).

É interessante observar que o isolado MG-PHIA, detectado em bananeira com genótipo AAAB, tem similaridade em nível de espécie com um isolado endógeno da Austrália. Estudos têm sugerido que os primeiros eventos de integração viral em plantas de bananeira ocorreram na espécie *M. balbisia* (genoma B), por meio de um processo de coevolução entre o vírus e a bananeira, o que conferiu certa resistência/tolerância em plantas desta espécie (ISKRA-CARUANA et al., 2014; GAYRAL et al., 2008, BOUSALEM, DOUZERY & SEAL, 2008). Isso indicaria que o vírus, que anteriormente era endógeno, tornou-se ativo em razão de estresses, como cultura de tecidos e condições ambientais adversas (COTE et al., 2010; DALLOT et al., 2001; NDOWORA et al., 1999).

Os cladogramas construídos com base na sequência de nucleotídeos (Figura 4) mostram uma clara subdivisão entre as espécies de *Badnavirus*. Observa-se, porém, que apesar de terem como origem um ancestral comum, as espécies se dividiram em dois clados, um com as espécies BSUCV, BSUDV e BSUGV e outro com a espécie BSMYV, explicando o fato desta última apresentar uma maior diversidade dos demais. O clado com as espécies Uganda C, D e G, por sua vez, se dividiu em dois subclados, sendo que em um deles a espécie G ficou sozinha e no segundo as espécies C e D se agruparam, mostrando uma maior proximidade entre elas. Os isolados da espécie BSOLV se agruparam em clados mais distantes dessas, apresentando maior proximidade com o isolado MG-PHIA e a sequência endógena (AY189414) e as espécies BSIMV e BSGFV.

Figura 4- Clodograma construído com base na sequência de nucleotídeos da região codificadora RT/RNaseH dos isolados de Badnavirus estudados juntamente com os do GenBank. Os valores foram obtidos pelo programa Mega 6.0 e teste neighbor-joining, com 2.000 repetições.

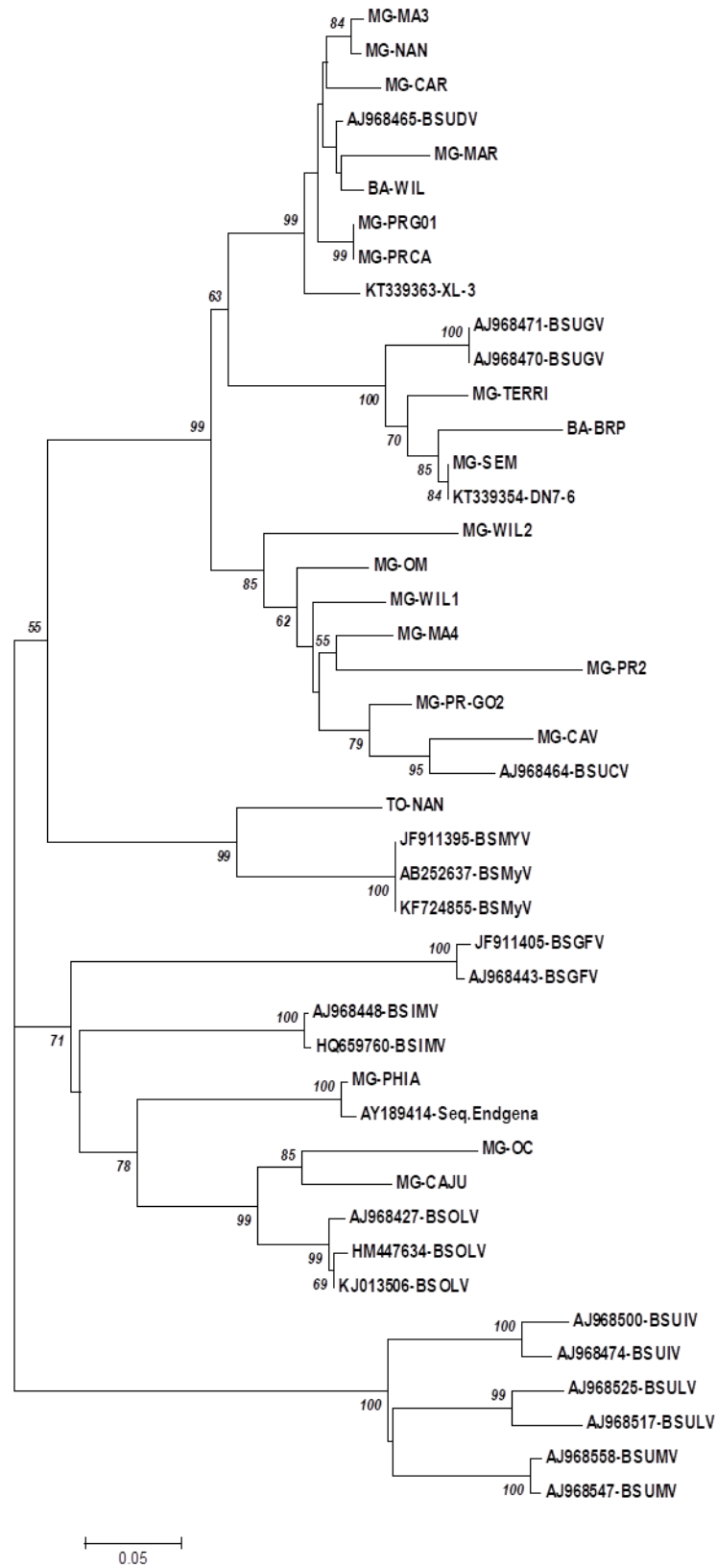


O cladograma construído com base na sequência de aminoácidos (Figura 5) apresentou a mesma tendência de separação entre as espécies, com pequenas modificações. Nele, as espécies C, D e G também ficaram no mesmo clado, mas foi a espécie G que ficou mais próxima da espécie D e a C se isolou no segundo subclado. As demais distribuições permaneceram as mesmas.

Alguns pesquisadores brasileiros tem estudado a estria da bananeira e sua diagnose no país. Em 2006a, Figueiredo e colaboradores analisaram amostras coletadas em diversas regiões do território brasileiro através do perfil eletroforético da PCR e encontraram quatro padrões de sequências de Badnavirus (BSVBR-1, BSVBR-2, BSVBR-3 e BSVBR-4), entretanto não confirmaram a infecção pela forma episomal do vírus e também não realizaram sequenciamento das amostras. Posteriormente a espécie referente ao padrão BSVBR-1 foi detectada como *Banana streak Uganda B vírus* (BSUBV) e diagnosticada nos estados do Pará e Amazonas (FIGUEIREDO et al, 2006b; BRIOSSO, PEREIRA & GASPAROTTO, 2011; POLTRONIERI et al, 2009). Silveira et al, 2007 verificaram os efeitos do *Banana streak vírus* no desenvolvimento de cultivares de bananeira. Figueiredo e Brioso, 2007, propuseram a detecção das viroses em mudas de bananeira através de um PCR multiplex. Em 2010, Lombardi et al., clonaram e induziram a expressão, em *E. coli*, de um sítio antigênico da região central da capa proteica do *Banana streak OL vírus* (BSOLV-rcCP), para obtenção de antígenos visando a produção de antissoros para a detecção da espécie BSOLV. Carnelossi et al, 2014 detectaram a forma episomal de *Banana streak OL vírus* (BSOLV) na cultivar “Nanicão Jangada” no Paraná através das técnicas RCA, restrição enzimática e posterior sequenciamento do isolado.

Entretanto a identificação de espécies de badnavirus no Brasil não tem sido comum, de modo que esse trabalho representa uma importante contribuição, não apenas para o conhecimento da sua ocorrência no país, mas também para subsidiar programas de certificação de mudas que dependem da diagnose desses vírus para determinar a sua sanidade.

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



6. CONCLUSÕES

A técnica RT-PCR apresentou a mesma eficiência e repetibilidade que a técnica RCA para a detecção de sequências episomais dos *Badnavirus*.

Foram identificadas cinco espécies de *Badnavirus* nas 35 amostras de bananeira analisadas: *Banana streak Brazilian A vírus* (BSBrAV), *Banana streak Mysore vírus* (BSMyV), *Banana streak Obino l'Ewai vírus* (BSOLV), *Banana streak Uganda G vírus* (BSUGV), *Banana streak Uganda D vírus* (BSUD) e *Banana streak Uganda C vírus* (BSUCV), sendo as duas últimas presentes no maior número de amostras.

A validação da técnica de RT-PCR para a diagnose de sequências episomais dos Badnavírus e a identificação de espécies presentes em diferentes campos onde a banana é cultivada, é uma contribuição relevante para o sistema de produção de mudas de bananeira no Brasil.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, P. C. M. S. **Detecção e caracterização molecular de isolados de banana streak vírus (BSV) no Brasil.** 2013. Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Lavras.

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

BOUSALEM, M.; DOUZERY, E. J. P.; SEAL, S. E. **Taxonomy, molecular phylogeny and evolution of plant reverse transcribing viruses (family Caulimoviridae) inferred from full-length genome and reverse transcriptase sequences.** Archives of virology, v. 153, n. 6, p. 1085-1102, 2008.

BRAITHWAITE, K. S., EGESKOV, N. M., & SMITH, G. R. (1995). **Detection of sugarcane bacilliform virus using the polymerase chain reaction.** *Plant disease (USA)*.

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

BRIOSO, P.S.T.; CORDEIRO, Z.J.M.; REZENDE, J.A.M.; KITAJIMA, E.W.; PIMENTEL J.P.; FIGUEIREDO, A.R. **Infecção mista em bananeiras pelos vírus do mosaico do pepino ("Cucumber mosaic virus" – CMV) e da risca da bananeira ("Banana streak virus" – BSV) no Brasil.** Summa Phytopathologica, Botucatu, v.26, n.2, p.257-259, 2000.

CARNELOSSI, P. R., BIJORA, T., FACCO, C. U., SILVA, J. M., PICOLI, M. H., SOUTO, E. R., & OLIVEIRA, F. T. D. (2014). **Episomal detection of Banana streak OL virus in single and mixed infection with Cucumber mosaic virus in banana 'Nanicão Jangada'.** Tropical Plant Pathology, 39(4), 342-346.

CHANG, S.; PURYEAR, J.; CAIRNEY, J. **A simple and efficient method for isolating RNA from pine trees.** *Plant molecular biology reporter*, v. 11, n. 2, p. 113-116, 1993.

CORDEIRO, Z. J. M. **Banana, produção: aspectos técnicos.** Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia. Série Frutas do Brasil, v 1, 2000.

CÔTE, F. X., GALZI, S., FOLLIOT, M., LAMAGNÈRE, Y., TEYCHENEY, P.-Y., AND ISKRA-CARUANA, M.-L. 2010. **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.** *Mol. Plant Pathol.* 11:137-144.

D'HONT, A., DENOEUDE, F., AURY, J. M., BAURENS, F. C., CARREEL, F., GARSMEUR, O., ... & DA SILVA, C. (2012). **The banana (*Musa acuminata*) genome and the evolution of monocotyledonous plants.** *Nature*, 488(7410), 213-217.

DAHAL, G., ORTIZ, R., TENKOUANO, A., HUGHES, J. D'A., THOTTAPPILLY, G., VUYLSTEKE, D., AND LOCKHART, B. E. L. 2000. **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 Pathol.* 49:68-79.

DALLOT, S., ACUÑA, P., RIVERA, C., RAMÍREZ, P., CÔTE, F., LOCKHART, B. E. L., AND CARUANA, M. L. 2001. **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).** *Arch. Virol.* 146:2179-2190.

DANIELLS, J. W., GEERING, A. D. W., BRYDE, N. J., AND THOMAS, J. E. 2001. **The effect of Banana streak virus on the growth and yield of dessert bananas in tropical Australia.** *Ann. Appl. Biol.* 139:51-60.

DANTAS, L. L.; SHEPHERD, K.; OLIVEIRA, S. de; SOARES FILHO, W. dos S. **Classificação botânica, origem, evolução e distribuição geográfica.** In: ALVES, E. J. (Org.). *A cultura da banana: aspectos técnicos, socioeconômicos e agroindustriais.* Brasília, DF: Embrapa SPI; Cruz das Almas: Embrapa-CNPMPF, 1997. 587 p.

DEAN, F. B., NELSON, J. R., GIESLER, T. L., & LASKEN, R. S. (2001). **Rapid amplification of plasmid and phage DNA using phi29 DNA polymerase and multiply-primed rolling circle amplification.** *Genome research*, 11(6), 1095-1099.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA E AGROPECUÁRIA (2020). **BANANA.** Disponível em: < <https://www.embrapa.br/mandioca-e-fruticultura/cultivos/banana> >. Acesso em: 20 jul 2020.

EVOMIC SCIENCE LLC, 2019. **Phi29-based DNA Rolling Circle Amplification (2019).** Disponível em:< <https://www.evomicsscience.com/rolling-circular-amplification>>. Acesso em: 28 abr. 2019.

FARGETTE, D., KONATE, G., FAUQUET, C., MULLER, E., PETERSCHMITT, M., & THRESH, J. M. (2006). **Molecular ecology and emergence of tropical plant viruses**. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 44, 235-260.

FIGUEIREDO, D. V., & BRIOSO, P. S. T. (2007). **PCR multiplex para a detecção de BSV e CMV em bananeiras micropropagadas**. *Summa phytopathologica*, 33(3), 229-232.

FIGUEIREDO, D. V.; MEISSNER FILHO, P. E.; SILVA NETO, S. P.; BRIOSO, P. S. T. **Deteção e análise da variabilidade de seqüências do Banana streak virus (BSV) em bananeiras no Brasil**. *Summa Phytopathologica, Botucatu*, v. 32, n. 2, p. 118-123, 2006a.

FIGUEIREDO, D.V.; CUNHA JUNIOR, J.O.; NOGUEIRA, M.S.R.; MONTANO, H.G.; BRIOSO, P.S.T. **Diversidade genética do Banana streak virus no Brasil**. In: REUNIÃO INTERNACIONAL DA ACORBAT, 27., 2006, Joinville. *Proceedings...* 2006b, v.2, p. 757-763.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **Banana Market Review - Preliminary results for 2019**. Disponível em: <<http://www.fao.org/3/ca7567en/ca7567en.pdf>>. Acesso em: 30/06/20.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **Banana facts and figures (2019)**. Disponível em:< <http://www.fao.org/economic/est/est-commodities/bananas/bananafacts/en/#.XFg6vlxKjIV>>. Acesso em: 18 jan. 2019.

FURUYA, N., SUASTIKA, G., & NATSUAKI, K. T. (2012). **First report and molecular characterization of exogenous banana steak Mysore virus from banana in Indonesia**. *Asian Journal of Plant Pathology*, 6(2), 41-47.

GAYRAL, P., BLONDIN, L., GUIDOLIN, O., CARREEL, F., HIPPOLYTE, I., PERRIER, X., & ISKRA-CARUANA, M. L. (2010). **Evolution of endogenous sequences of banana streak virus: what can we learn from banana (Musa sp.) evolution?**. *Journal of Virology*, 84(14), 7346-7359.

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.)**. *J Mol Evol.* v.69, p.65-80. 2009.

GAYRAL, P., NOA-CARRAZANA, J. C., LESCOT, M., LHEUREUX, F., LOCKHART, B. E., MATSUMOTO, T., ... & ISKRA-CARUANA, M. L. (2008). **A single Banana streak virus integration event in the banana genome as the origin of infectious endogenous pararetrovirus**. *Journal of virology*, 82(13), 6697-6710.

GEERING, A. D. W., and HULL, R. (2011a). **Virus Taxonomy: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses**. Burlington: Elsevier.

GEERING, A. D., PARRY, J. N., & THOMAS, J. E. (2011b). **Complete genome sequence of a novel badnavirus, banana streak IM virus**. *Archives of virology*, 156(4), 733-737.

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

GEERING, A. D. W., POOGGIN, M. M., OLSZEWSKI, N. E., LOCKHART, B. E. L., AND THOMAS, J. E. 2005b. **Characterisation of Banana streak Mysore virus and evidence that its DNA is integrated in the B genome of cultivated Musa**. *Arch. Virol.* 150:787-796.

GEERING, A. D. W., OLSZEWSKI, N. E., DAHAL, G., THOMAS, J. E., AND LOCKHART, B. E. L. 2001. **Analysis of the distribution and structure of integrated Banana streak virus DNA in a range of Musa cultivars**. *Mol. Plant Pathol.* 2:207-213.

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

HARPER, G., HART, D., MOULT, S., HULL, R., GEERING, A., & THOMAS, J. (2005). **The diversity of Banana streak virus isolates in Uganda**. *Archives of virology*, 150(12), 2407-2420.

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

HARPER, G., DAHAL, G., THOTTAPPILLY, G., & HULL, R. (1999). **Detection of episomal banana streak badnavirus by IC-PCR**. *Journal of Virological Methods*, 79(1), 1-8.

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

HESLOP-HARRISON, J. S.; SCHWARZACHER, T. **Domestication, genomics and the future for banana**. *Annal of Botany*, Oxford, v. 100, n. 5, p. 1073-1084, Aug. 2007.

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

HOLLANDA FERREIRA, C. H. L., JORDÃO, L. J., RAMOS-SOBRINHO, R., de MEDEIROS FERRO, M. M., da SILVA, S. J. C., ASSUNÇÃO, I. P., & de Andrade Lima, G. S. (2019). **Diversification into the genus badnavirus: phylogeny and population genetic variability**. *Revista Ciência Agrícola*, 17(2), 59-72.

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

ICTV-International Committee on Taxonomy of Virus. Disponível em: <<https://talk.ictvonline.org/>> Acessado em: 22 jan.2019.

ISKRA-CARUANA, M. L., DUROY, P. O., CHABANNES, M., & MULLER, E. (2014). **The common evolutionary history of badnaviruses and banana.** *Infection, Genetics and Evolution*, 21, 83-89.

JAMES, A. P., GEJSKES, R. J., DALE, J. L., & HARDING, R. M. (2011). **Development of a novel rolling-circle amplification technique to detect Banana streak virus that also discriminates between integrated and episomal virus sequences.** *Plant disease*, 95(1), 57-62a.

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

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.

JONES, R. A. C. **Determining ‘threshold’ levels for seed-borne virus infection in seed stocks.** *Virus Research*, v. 71, n. 1-2, p. 171-183, 2000.

KING, A.M.Q.; ADAMS, M.J.; CARSTENS, E.B.; LEFKOWITZ, E.J., **International Committee on Taxonomy of Viruses** (Elsevier Academic Press, San Diego, 2011)

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

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 acuminata Vietnam virus isolated from *Musa acuminata siamea* (banana cultivar).** *Archives of Virology*, New York, v. 152, n. 7, p. 1409-1416, Jan. 2007.

LIU, F., FENG, L., CHEN, X., HAN, Y., LI, W., XU, W., ... & LIN, M. (2012). **Simultaneous detection of four banana viruses by multiplex PCR.** *Journal of Phytopathology*, 160(11-12), 622-627.

LODHI, M. A., YE, G. N., WEEDEN, N. F., & REISCH, B. I. (1994). **A simple and efficient method for DNA extraction from grapevine cultivars and *Vitis* species.** *Plant Molecular Biology Reporter*, 12(1), 6-13.

LOMBARDI, R., HARAKAVA, R., & COLARICCIO, A. (2010). **Clonagem e purificação de fragmento da proteína capsidial de Banana streak OL virus.** *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 45(8), 811-817.

LOCKHART, B.E.L , *Phytopathology* 76: 995, 1986.

LOCKHART, B.E.L., *Phytopathology* 80, 127–131 (1990)

MEISSNER FILHO, P. E. **Viroses da Bananeira**. Jornal Agrosoft Brasil, 2011. Disponível em: < <http://agrosoft.com/agropag/216129.htm>>. Acessado em: 11 ago 2020.

MEISSNER FILHO, P.E.; BRIOSO P.S.T. **Frutas do Brasil: banana fitossanidade: doenças causadas por vírus**. Brasília: EMBRAPA, 2000. p.78-81.

NDOWORA, T., DAHAL, G., LAFLEUR, D., HARPER, H., HULL, R., OLSZEWSKI, N. E., AND LOCKHART, B. 1999. **Evidence that badnavirus infection in Musa can originate from integrated pararetroviral sequences**. *Virology* 255:214-220.

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

ONSARIGO, M. N. **Assessment of banana streak MY virus-based infectious clone vectors in Musa ssp**. 2017. Tese de Doutorado. Queensland University of Technology.

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

PEREIRA, J. C. R.; MOREIRA, A.; GASPAROTO, L. **Estado nutricional de bananeiras infectadas por estirpes de Banana streakvirus no Amazonas**. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v. 28, p. S394, 2003. Suplemento. Citado em BRIOSO, P. S. T.; PEREIRA, J. C. R.; GASPAROTTO, L. Ocorrência de badnavirus em frutos de bananeira no estado do Amazonas, Brasil. *Revista Brasileira de Fruticultura*, Jaboticabal, v. 33, n. 4, p. 1353-1355, 2011.

POLTRONIERI, L. S., FIGUEIREDO, D. V., BRIOSO, P. S. T., VERZIGNASSI, J. R., & CARDOSO, S. S. (2009). **Constatação Do Banana Streak Uganda B Virus Em Bananeiras No Estado Do Pará**. *Summa Phytopathologica*, 35(1), 74-74.

RAO, X. Q., WU, Z. L., WANG, W., ZHOU, L., SUN, J., & LI, H. P. (2020). **Genetic diversity analysis reveals new badnaviruses infecting banana in South China**. *Journal of Plant Pathology*, 1-11.

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.

ROTHNIE, H. M., CHAPDELAIN, Y., & HOHN, T. (1994). **Pararetroviruses and retroviruses: a comparative review of viral structure and gene expression strategies**. In *Advances in virus research* (Vol. 44, pp. 1-67). Academic Press.

SHAHID, M.S.; ABOUGHANEM-SABANADZOVIC, N.; SABANADZOVIC, S.; TZANETAKIS, I.E. **Genomic characterization and population structure of a Badnavirus infecting blackberry**. *Plant disease*. v.101, p. 110-115. 2017.

SHARMA, Susheel Kumar et al. **Subpopulation level variation of banana streak viruses in India and common evolution of banana and sugarcane badnaviruses**. *Virus genes*, v. 50, n. 3, p. 450-465, 2015.

SILVA, S.O.; AMORIM, E.P.; SANTOS-SEREJO, J.A.; FERREIRAS, C.F.; RODRIGUEZ, M.A.D. **Melhoramento Genético da Bananeira: estratégias e tecnologias disponíveis**. *Revista Brasileira de Fruticultura*. v.35, p. 919-931. 2013.

SILVA, S. O.; SANTOS-SEREJO, J. A.; CORDEIRO, Z. J. M. **O cultivo da bananeira**. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2004. Capítulo 4. P. 45

SILVA-NETO, S.P.; SILVA, M.S. **Cultura de tecidos no controle de viroses na bananeira no Brasil**. Documentos 274. Embrapa Cerrados. 2009.

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

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

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

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

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

SISTEMA IBGE DE RECUPERAÇÃO AUTOMÁTICA – SIDRA. **LEVANTAMENTO SISTEMÁTICO DA PRODUÇÃO AGRÍCOLA** (2020).Disponível em :<<https://sidra.ibge.gov.br/tabela/1618>>. Acesso em : 30.06.2020.

SVAROVSKAIA, E.S.; CHESLOCK, S.R.; ZHANG, W.H.; HU, W.S.; PATHAK, V.K. **Retroviral mutation rates and reverse transcriptase fidelity**. *Frontiers in Bioscience*. 2003, 8, 117–134.

SUKAL, A. C., KIDANEMARIAM, D. B., DALE, J. L., HARDING, R. M., & JAMES, A. P. (2019). **Assessment and optimization of rolling circle amplification protocols for the detection and characterization of badnaviruses**. *Virology*, 529, 73-80.

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

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

YANG, I. C. 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.

YOT-DAUTHY & BOVÉ, *Fruits* 21: 449, 1966.

ZHANG, J. et al. **Multiplex detection of three banana viruses by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP)**. *Tropical Plant Pathology*, v. 43, n. 6, p. 543-551, 2018.

WAMBULWA, M. C., WACHIRA, F. N., KARANJA, L. S., & MUTURI, S. M. (2012). **Rolling circle amplification is more sensitive than PCR and serology-based methods in detection of Banana streak virus in musa germplasm**. *American Journal of Plant Sciences*, 3(11), 1581.