

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
DEPARTAMENTO DE AGRONOMIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

PATRÍCIA ROSIN CARNELOSSI

Micropropagação de bananeiras, detecção e identificação sorológica e molecular  
do *Cucumber mosaic virus* e do *Banana streak virus*

Maringá

2013

PATRÍCIA ROSIN CARNELOSSI

Micropropagação de bananeiras, detecção e identificação sorológica e molecular  
do *Cucumber mosaic virus* e do *Banana streak virus*

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia do Departamento de Agronomia, Centro de Ciências Agrárias da Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Agronomia.

Área de concentração: Proteção de Plantas

Orientador: Prof. Dr. Eliezer Rodrigues de Souto

Maringá

2013

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
(Biblioteca Central - UEM, Maringá, PR, Brasil)

C289m Carnellosi, Patricia Rosin  
Micropropagação de bananeiras, detecção e identificação sorológica e molecular do *Cucumber mosaic virus* e do *Banana streak virus* / Patricia Rosin Carnellosi. -- Maringá, 2013.  
xvi, 113 f. : il. color., figs., tabs., retrs.

Orientador : Prof. Dr. Eliezer Rodrigues de Souto.

Tese (doutorado em Agronomia) - Universidade Estadual de Maringá, Departamento de Agronomia, Programa de Pós Graduação em Agronomia, 2013.

1. Bananeira - Micropropagação - *in vitro*. 2. Bananeira - *Cucumber mosaic virus* - DAS-ELISA - RT-PCR. 3. Bananeira - *Banana streak virus* - RCA - DAS-ELISA. I. Souto, Eliezer Rodrigues de, orient. II. Universidade Estadual de Maringá. Departamento de Agronomia. Programa de Pós Graduação em Agronomia. III. Título.

CDD 21.ed.632.8

Zss-1480

# FOLHA DE APROVAÇÃO

PATRÍCIA ROSIN CARNELOSSI

Micropropagação de bananeiras, detecção e identificação sorológica e molecular  
do *Cucumber mosaic virus* e do *Banana streak virus*

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia do Departamento de Agronomia, Centro de Ciências Agrárias da Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Agronomia pela Comissão Julgadora composta pelos Doutores:

## COMISSÃO JULGADORA

---

Dr. Gilmar Roberto Zaffari  
Pesquisador da EPAGRI-SC

---

Dr. José Segundo Giampan  
Pesquisador do IAPAR-Londrina

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Adriana Gonela  
Universidade Estadual de Maringá

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Claudete Aparecida Mangolin  
Universidade Estadual de Maringá

---

Prof. Dr. Eliezer Rodrigues de Souto  
Universidade Estadual de Maringá (Presidente)

Aprovada em: 1 de março de 2013.

Local de defesa: Anfiteatro 2, Bloco J-45, *campus* da Universidade Estadual de Maringá.

## DEDICATÓRIA

Aos meus pais que sempre me apoiaram.  
Dedico mais esta etapa da minha vida.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pelo dom da vida, por sempre iluminar o meu caminho e por permitir mais esta conquista em minha vida.

Aos meus pais Maria Antônia Rosin Carnelossi e Nercio João Carnelossi, pelo amor, pela compreensão e pelo incentivo. E a toda minha família que, mesmo distante, tanto me apoiou e incentivou.

Ao professor Dr. Eliezer Rodrigues de Souto, pela orientação, pela disponibilidade, pela dedicação e pela leitura crítica desta tese.

Ao Programa de Pós-graduação em Agronomia da Universidade Estadual, pela formação profissional e pela oportunidade oferecida.

À CAPES, pela concessão de bolsa de estudos durante o curso.

Aos financiadores do projeto, FINEP (Financiadora de Estudos e Projetos), Sebrae (Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas), CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico).

Ao meu namorado Andre Luiz, pelo incentivo, apoio e companheirismo. Aos meus amigos queridos do laboratório de Virologia Vegetal, Taise, Cassiele, Jaqueline, Betty, Evelyn, Maikon, e Marcelo, pela amizade, pelo companheirismo e pelos momentos que passamos juntos. Aos colegas conquistados ao longo do curso de doutorado, principalmente, à Tatiane, à Cleiltan, à Carol, à Marianna, o Mauro, o Danilo, à Érika e às minhas professoras queridas Adriana Gonela e Kátia que foram muito importantes na minha trajetória.

À minha grande amiga Líliam, pelas correções ortográficas realizadas neste trabalho, além de toda a atenção e carinho que me foram concedidas.

Aos membros da banca examinadora, pelo desvelo com que aceitaram o convite, pelo apoio e pelas contribuições essenciais para o enriquecimento do trabalho.

## EPÍGRAFE

Não é o quanto você faz, mas quanto  
amor você coloca ao fazer. Não é quanto  
você doa, mas quanto amor coloca ao  
doar.

(Madre Tereza de Calcutá).

## Micropropagação de bananeiras, detecção e identificação sorológica e molecular do *Cucumber mosaic virus* e do *Banana streak virus*

### RESUMO GERAL

Este trabalho teve como objetivos padronizar um método de multiplicação *in vitro* de bananeiras, indexá-las para o vírus do mosaico do pepino (*Cucumber mosaic virus* - CMV) e para o vírus das estrias da bananeira (*Banana streak vírus* - BSV) por meio do teste sorológico DAS-ELISA. A presença destes vírus também foi detectada por PCR em amostras de bananeiras colhidas em áreas de produção da região Norte do Paraná, o que serviu para a caracterização molecular parcial dos isolados. A micropropagação *in vitro* de bananeiras do grupo Cavendish resultou na produção de 3.653 mudas a partir de 151 gemas, sendo que a maior produção foi obtida com os rizomas originários de perfilhos medindo de 20 a 60 cm. O CMV e o BSV foram detectados tanto nas amostras de plantas provenientes das áreas de cultivo, como em 47% das 53 plantas obtidas por micropropagação. O sequenciamento do produto de amplificação por RT-PCR permitiu classificar o isolado de CMV obtido de bananeira no subgrupo IA. A amplificação por círculo rolante (RCA) utilizada nos protocolos para a detecção de formas episomais do BSV resultou na amplificação de aproximadamente 7,5 Kpb. Após o sequenciamento genômico parcial de uma região do DNA amplificado por RCA e comparações realizadas com sequências de espécies de BSV reconhecidas pelo ICTV e depositadas no GenBank, o isolado de BSV proveniente de Andirá foi identificado como sendo da espécie *Banana streak Obino I'Ewai virus* (BSOLV), com 99% de homologia. Pode-se concluir com este trabalho que o *Cucumber mosaic virus* e o *Banana streak virus* estão presentes em áreas de cultivo de bananeiras do Norte do Paraná, em infecção simples e mistas, evidenciando assim, a importância da indexação viral para a garantia de qualidade fitossanitária dos bananais da região.

**Palavras-chave:** CMV. BSV. DAS-ELISA. RT-PCR. RCA.



# Clonal production of banana seedlings, serological and molecular detection and identification of *Cucumber mosaic virus* and *Banana streak virus*

## **GENERAL ABSTRACT**

The objective of this study was to standardize a method for in vitro multiplication of banana seedlings, and indexing for *Cucumber mosaic virus* (CMV) and *Banana streak virus* (BSV) through serological DAS-ELISA tests. Both virus were also detect by PCR, on samples taken from production areas of northern Paraná, seeking partial molecular characterization of viral isolates. The in vitro micropropagation of Cavendish bananas resulted in the production of 3653 seedlings from 151 gems, and the highest production was obtained with the rhizomes from tillers measuring 20-60 cm. The CMV and BSV were detected from plant samples collected in banana growing areas, as in 47% of the 53 plants obtained by micropropagation. Sequencing of the amplification product obtained by RT-PCR allowed the classification of the CMV isolate in the subgroup IA. The rolling circle amplification (RCA) used in protocols for detection of BSV episomal forms resulted in the amplification of approximately 7,5 Kbp. After partial sequencing of the RCA product and comparisons with sequences of BSV deposited in GenBank, the virus isolate from Andirá was identified as a species of *Banana streak virus Obino I'Ewai* (BSOLV) with 99% homology. This work indicated that CMV and BSV were found in single and in mixed infections in production áreas of northern Paraná, evidencing the importance of viral indexing for the fitossanitary quality of banana produced in this region.

**Keywords:** CMV. BSV. DAS-ELISA. RT-PCR. RCA.

## LISTA DE TABELAS

Capítulo 1	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	3
Tabela 1	Comparação entre o número de mudas e o tempo necessário para a obtenção de plantas nos diferentes métodos de propagação vegetativa .....	12
Tabela 2	Virose, agente causal e distribuição geográfica dos vírus que infectam a bananeira .....	15
Tabela 3	Relação das espécies de <i>Banana streak virus</i> reconhecidas pelo <i>International Committee on Taxonomy of Viruses</i> (ICTV) até 2012 e presença assinalada no Brasil .....	20
Tabela 4	Relação de isolados do BSV com sequências depositadas no GenBank com algumas já constatadas no Brasil .....	21
Capítulo 2	Micropropagação <i>in vitro</i> de genótipos de bananeira e indexação para o <i>Cucumber mosaic virus</i> e <i>Banana streak vírus</i> .....	27
Tabela 1	Rizomas de diferentes variedades de bananeiras utilizados na padronização da metodologia de micropropagação <i>in vitro</i> .....	42
Tabela 2	Classificação de acordo com o tamanho e diâmetro dos perfilhos de bananeiras da variedade Jangada, provenientes de Andirá-PR, utilizados na micropropagação <i>in vitro</i> .....	43
Tabela 3	Resultados obtidos após a padronização do método de micropropagação <i>in vitro</i> , utilizando explantes de bananeiras do grupo Cavendish em 5 subcultivos .....	50
Tabela 4	Número de gemas oxidadas, número e porcentagem de gemas viáveis nos quatro diferentes grupos de rizomas de bananeiras da variedade Jangada ....	53
Tabela 5	Fator de multiplicação dos brotos nos subcultivos 2, 3 e 4 e média de brotos por rizoma para os 4 grupos de bananeiras da variedade ‘Jangada’ .....	54
Tabela 6	Média de brotos obtidos por gema apical nos subcultivos 2, 3 e 4 para os 4 grupos de bananeiras da variedade Jangada .....	56
Tabela 7	Deteção do CMV e do BSV em variedades de bananeiras micropropagadas <i>in vitro</i> por meio do teste sorológico DAS-ELISA .....	58

Capítulo 3	Caracterização molecular parcial de um isolado do <i>Cucumber mosaic virus</i> detectado em bananeiras no norte do Paraná .....	62
Tabela 1	Relação das espécies de plantas inoculadas mecanicamente com o isolado viral de bananeira .....	68
Tabela 2	Sintomas induzidos em diferentes espécies de plantas inoculadas com o isolado viral de bananeira proveniente de Novo Itacolomi-PR .....	74
Tabela 3	Porcentagem de identidade da sequência de 459 pb do CMV de bananeira ‘Maçã’, obtida neste trabalho, com sequências do CMV depositadas no GenBank .....	79
Tabela 4	Sequências do CMV (gene da capa protéica) depositadas no GenBank, utilizadas no alinhamento com a sequência do CMV de bananeira ‘Maçã’ para a construção da árvore filogenética .....	79
Capítulo 4	Detecção e caracterização molecular parcial do <i>Banana streak virus</i> isolado de bananeiras cultivadas no norte do Paraná .....	83
Tabela 1	Detecção do BSV e CMV em plantas de bananeiras das variedades Jangada e Maçã através do teste sorológico DAS-ELISA .....	98
Tabela 2	Detecção do BSV em variedades de bananeiras micropropagadas <i>in vitro</i> , utilizando os métodos de detecção: DAS-ELISA, PCR e RCA (Amplificação por círculo rolante) .....	105
Tabela 3	Detecção do BSV em amostras de bananeiras provenientes do campo, utilizando o DAS-ELISA, a PCR e RCA (Amplificação por círculo rolante) .....	106
Tabela 4	Acessos do GenBank de isolados do <i>Banana streak virus</i> utilizados na comparação com sequências do BSV da bananeira ‘Jangada’13.....	108
Tabela 5	Acessos de sequências de BSV depositadas no GenBank utilizadas na análise filogenética com o isolado de bananeira ‘Jangada’ 13, proveniente de Andirá-PR .....	109

## LISTA DE FIGURAS

Capítulo 1	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	3
Figura 1	Tipos de mudas de bananeiras micropropagadas (a); tipo chifrão(b); tipo chifre (c); tipo chifrinho (d); rizoma de planta adulta (e); rizoma com filho aderido (f); pedaço de rizoma (g); e muda tipo guarda-chuva (h), segundo Santos-Serejo et al. (2006) .....	9
Figura 2	Organização genômica do CMV. Número de nucleotídeos (nt) e tamanho das proteínas codificadas, kDa (kilodaltons), segundo Roossinck (2002) .....	17
Figura 3	Sintomas de estrias amarelas cloróticas e distorção foliar induzidos pelo <i>Cucumber mosaic virus</i> em plantas de bananeiras provenientes da região de Andirá no Norte do Paraná .....	18
Figura 4	Organização do genoma do BSV. O círculo representa o genoma completo do DNA de fita dupla. O círculo interno mostra o mapeamento do transcrito de RNA. Os arcos exteriores indicam as posições das três regiões codificadoras (ORFs), segundo Harper e Hull (1998) .....	20
Figura 5	Sintomas do BSV em bananeira da variedade Jangada, de Andirá-PR. A: folhas com estrias cloróticas e necróticas ao longo da lâmina foliar e distorção foliar; B: manchas necróticas no caule .....	22
Figura 6	Princípio da amplificação por círculo-rolamente. As linhas azuis indicam a sequência de DNA alvo, as linhas verdes representam os <i>primers</i> e as linhas vermelhas representam o novo DNA sintetizado pela polimerase. As pontas de seta indicam a extremidades 3' de polimerização das fitas de DNA. (a) modelo linear e <i>primer</i> único. Após a ligação do <i>primer</i> , a polimerase sintetiza uma fita complementar. (b) modelo circular e com um único <i>primer</i> . A polimerase sintetiza uma fita complementar iniciando pelo <i>primer</i> . Depois do ciclo completo, o <i>primer</i> e a fita sintetizada são deslocados e a síntese de DNA continua em ciclos adicionais. (c) modelo circular e múltiplos <i>primers</i> aleatórios. A síntese é iniciada com os múltiplos <i>primers</i> ligados a um molde. A síntese de DNA com o deslocamento da fita é realizada como em (b). No entanto, <i>primers</i> ainda presentes são utilizados como pontos de iniciação para a síntese de DNA	

	adicionais, conforme Johne et al.,(2009) .....	29
Capítulo 2	Micropropagação <i>in vitro</i> de genótipos de bananeira e indexação para o <i>Cucumber mosaic virus</i> e <i>Banana streak vírus</i> .....	37
Figura 1	Classificação dos perfilhos de bananeiras utilizados como fonte de rizomas, da variedade Jangada, provenientes de uma área de produção comercial do município de Andirá-PR, agrupados de acordo com o seu tamanho e diâmetro .....	43
Figura 2	Preparo dos rizomas de bananeiras. A: corte inicial; B: redução do tamanho; C: desinfecção; D: retirada da gema apical .....	44
Figura 3	Estabelecimento <i>in vitro</i> dos ápices caulinares das bananeiras em diferentes estágios de desenvolvimento. A: gema apical inoculada em meio de cultura MS; B: corte longitudinal da gema; C: brotos iniciais obtidos da gema .....	45
Figura 4	Brotações de bananeiras da variedade Jangada, micropropagadas <i>in vitro</i> , em meio de cultura MS .....	46
Figura 5	A: Plantas de bananeiras da variedade Jangada atingindo a altura do frasco, prestes a serem transferidas para o meio de enraizamento; B: Plantas apresentando tamanhos ideais para iniciar o processo de aclimação .....	47
Figura 6	Aclimação das plantas de bananeiras das variedades Jangada, Grande Naine, IAC 2001 e Nanicão Comum em casa de vegetação pertencente ao Laboratório de Biotecnologia Vegetal .....	47
Figura 7	Etapas do processo de micropropagação <i>in vitro</i> de bananeira e o tempo médio para obtenção das mudas, conforme o protocolo proposto por Zafari et al., (1994), seguindo as etapas conforme descrito por Alves et al. (2004).....	48
Figura 8	Plantas de bananeiras das variedades Jangada aclimatadas em casa de vegetação. A: plantas após o transplante. B: mudas após 60 dias de aclimação .....	51
Figura 9	Comparação entre as plantas de bananeiras produzidas <i>in vitro</i> . A: plantas com características anormais, com coloração verde claro e caule engrossado e alongado. B: plantas desenvolvidas com coloração verde escuro intenso .....	51
Figura 10	Plantas de bananeiras da variedade Jangada em bandejas plásticas. A:	

	plantas com coloração amarelada e aspecto queimado alguns dias após a aclimação. B: plantas com 30 dias após serem transferidas para bandejas plásticas com emissão de novas brotações .....	52
Figura 11	Número de brotos de bananeiras da variedade Jangada emitidos nos subcultivos 2, 3 e 4 para os grupos 1, 2, 3 e 4 .....	55
Figura 12	Média de brotos emitidos por gema apical, da variedade de bananeira Jangada, nos subcultivos 2, 3 e 4, a partir dos grupos 1, 2, 3 e 4, cultivados no meio de cultura MS .....	57
Capítulo 3	Caracterização molecular parcial de um isolado do <i>Cucumber mosaic virus</i> detectado em bananeiras no norte do Paraná .....	62
Figura 1	Sintomas de mosaico e estrias cloróticas observados em folhas de bananeiras da variedade Jangada, provenientes do Município de Novo Itacolomi-PR .....	67
Figura 2	Sintomas induzidos em plantas de: A-1 e A-2: <i>Cucumis anguria</i> (Maxixe); B-1 e B-2: <i>Cucumis melo</i> cv. ‘Sunrise’ (Melão); C-1 e C-2: <i>Cucumis sativus</i> (Pepino); D-1 e D-2: <i>Cucurbita moschata</i> Duch (Abóbora menina); E-1 e E-2: <i>Cucurbita pepo</i> cv. ‘Caserta’ (Abóbora) .....	73
Figura 3	Sintomas em <i>Cucurbita pepo</i> cv. ‘Caserta’ (Abóbora). A: planta sadia; B: planta inoculada .....	75
Figura 4	Valores de absorbância das leituras dos ensaios DAS-ELISA em bananeiras com o antissoro para o CMV (Agdia <sup>®</sup> ), na diluição de 1/200. Amostras de bananeiras das variedades Jangada, Maçã; controle (+) bananeira infectada com CMV; controle (-) bananeira sadia; controle (-) bananeira sadia multiplicado por 2 .....	76
Figura 5	Amplificações por RT-PCR de fragmentos de DNA com aproximadamente 500 pb, com oligonucleotídeos para o CMV. M: Marcador molecular – 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen <sup>®</sup> ); 1: amostra sem DNA; 2: Abóbora ‘Caserta’ inoculada com CMV; 3: Abóbora ‘Caserta’ sadia; 4: bananeira ‘Grand Naine’(1); 5: bananeira ‘Grand Naine’ (2); 6: bananeira ‘Maçã’ .....	77
Figura 6	Amplificações por RT-PCR de fragmentos de DNA com aproximadamente 500 pb, com oligonucleotídeos para o CMV. M:	

	Marcador molecular – 1 Kb Plus DNA <i>Ladder</i> (Invitrogen®); 1: Abóbora ‘Caserta’ inoculada com CMV; 2, 3, 4 e 5: bananeiras ‘Jangada’ amostras J1, J2, J6 e J7; 6: bananeira ‘Grand Naine’ micropropagada <i>in vitro</i> ..... 78	78
Figura 7	Árvore filogenética obtida a partir do alinhamento da sequência do isolado de bananeira ‘Maçã’ (CMV-Bananeira PR-BR) com sequências do CMV (subgrupos IA, IB e II) depositadas no GenBank. Os números sobre os ramos indicam a porcentagem de repetições obtidas nas análises de bootstrap (1.000 repetições) ..... 80	80
Capítulo 4	Detecção e caracterização molecular parcial do <i>Banana streak virus</i> isolado de bananeiras cultivadas no norte do Paraná ..... 83	83
Figura 1	Sintomas de estrias cloróticas ao longo da lâmina foliar provavelmente associados à infecção por BSV em bananeiras da variedade Jangada provenientes de Andirá-PR ..... 88	88
Figura 2	Modelo esquemático da amplificação por círculo rolate (RCA), conforme o protocolo do kit <i>TempliPhi Amplification</i> (Amersham Biosciences) (GE Healthcare®) ..... 92	92
Figura 3	Valores de absorvância das leituras dos ensaios DAS-ELISA em bananeiras para o <i>Banana streak vírus</i> , utilizando antissoro para o <i>Sugarcane bacilliform virus</i> (SCBV) da Agdia®, na diluição de 1/200, em amostras de bananeiras das variedades Jangada, Maçã, controle (+) bananeira infectada com CMV; controle (-) bananeira sadia; controle (-) bananeira sadia multiplicado por 2; diluição das amostras em 1/10 ..... 96	96
Figura 4	Fragmentos de DNA de aproximadamente 600 pb em amostras de bananeiras, utilizando o par de <i>primers</i> Badna FP e Badna RP para detecção do BSV. M: Marcador molecular – 1 Kb Plus DNA <i>Ladder</i> (Invitrogen®); 1 ao 7: amostras de bananeiras ‘Jangada’ do J1 a J7 ..... 99	99
Figura 5	Fragmentos de DNA com aproximadamente 600 pb em amostras de bananeiras, utilizando o par de <i>primers</i> Harper’s 1A-4’ para detecção do BSV. M: Marcador molecular – 100 pb DNA <i>Ladder</i> (Invitrogen®); 1: Controle negativo, sem DNA; 2: ‘Grand Naine’ (1) (cultura de tecidos); 3: ‘Grand Naine’ (2) (cultura de tecidos); 4: ‘Jangada’ (cultura de tecidos); 5: ‘IAC 2001’ (cultura de tecidos); 6 e 7: ‘Jangada’, amostras J10 e J13 ... 100	100

Figura 6	Fragmentos de DNA com aproximadamente 1.300 pb em amostras de bananeiras, utilizando o par de <i>primers</i> 5345F e 6681R para detecção do BSV. M: Marcador molecular – 1 Kb Plus DNA <i>Ladder</i> (Invitrogen®); A – 1 ao 4 e 7: ‘Jangada’, amostras J1, J4, J7, J11 e J10; 5: ‘Jangada’ (3) (cultura de tecidos); 6: ‘Grand Naine’ (Itajaí-SC). B – 1 ao 7: ‘Jangada’, amostras J2, J3, J5, J6, J7, J8 e J9 .....	101
Figura 7	Fragmentos de DNA com aproximadamente 1.300 pb em amostras de bananeiras, utilizando o par de <i>primers</i> 5345F e 6681R para detecção do BSV. Marcador molecular – 1 Kb Plus DNA <i>Ladder</i> (Invitrogen®); A – 1: controle negativo, sem DNA; 2: ‘Jangada’ (J14); 3: ‘Nanicão Comum’ (1); 4: ‘Grand Naine’ (1); 5: ‘IAC 2001’ (1); 6: ‘Prata Anã’; 7: ‘Maçã’. B – 1: ‘Jangada’, amostras J12; 2: ‘IAC 2001’ (2); 3: ‘Grand Naine’ (1); 4: ‘Grand Naine’ (2); 5: ‘Grand Naine’ (Itajaí-SC); 6: ‘Jangada’, amostras J13 .....	101
Figura 8	Fragmentos de DNA com aproximadamente 7,5 kpb obtidos por amplificação por círculo rolante (RCA), digeridos com <i>KpnI</i> , em bananeira da variedade Jangada 13. M: Marcador molecular – 1 Kb Plus DNA <i>Ladder</i> (Invitrogen®); 1, 2 e 3: amostras J13, com os <i>primers</i> Harper’s 1A-4’; 4 e 5: amostra J13, com os <i>primers</i> Badna FP e Badna RP.....	102
Figura 9	Fragmentos de DNA com aproximadamente 7,5 kpb obtidos por amplificação por círculo rolante (RCA), digeridos com a enzima de restrição <i>KpnI</i> em amostras de bananeiras da variedade Jangada, utilizando os <i>primers</i> Harper’s 1A-4’ para detecção do BSV. M: Marcador molecular – 1 Kb DNA <i>Ladder</i> (Promega®); 1 ao 7: amostras J1, J4, J7, J14, J10, J12 e J13.....	103
Figura 10	Fragmentos de DNA com aproximadamente 7,5 kpb por amplificação por círculo rolante (RCA), digeridos com a enzima de restrição <i>KpnI</i> , em amostras de bananeiras micropropagadas <i>in vitro</i> , utilizando o par de <i>primers</i> Harper’s 1A-4’ para detecção do BSV. M: Marcador molecular – 1 Kb Plus DNA <i>Ladder</i> (Invitrogen®); 1: ‘Grand Naine’ (1); 2: ‘Grand Naine’ (2); 3: ‘Nanicão Comum’ (1); 4: ‘Grand Naine’ (Itajaí-SC); 5: ‘IAC 2001’ (1); 6: ‘IAC 2001’ (2); 7: ‘Jangada’ (3) .....	103



Figura 11	<p>Analise de RCA (<i>Rolling-circle amplification</i>) com Harper's primers 1A-4' a partir de DNA extraído da amostra J-13, 1: produto de RCA, 2- Produto de RCA digerido com <i>KpnI</i>, 3- Digerido com <i>BamHI</i>, 4- Digerido com <i>EcoRI</i>, 5- Digerido com <i>XbaI</i>; M-1Kbp plus DNA Ladder (Invitrogen®).....</p>	104
Figura 12	<p>Árvore filogenética construída a partir do alinhamento de parte dos nucleotídeos do isolado 'Jangada' 13 (600 pb), correspondendo a uma região da ORF III que codifica a transcriptase reversa (RT) e a ribonuclease H. Foram comparadas sequências de BSV de diversas origens. Os números sobre os ramos indicam a porcentagem de repetições obtidas nas análises de bootstrap (1.000 repetições) .....</p>	109

## SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL .....	1
CAPÍTULO 1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	3
1 A cultura da bananeira ( <i>Musa</i> spp.) .....	4
2 Importância socioeconômica da banana no mundo e no Paraná .....	5
3 Classificação botânica, morfologia e evolução da bananeira .....	6
4 Métodos de propagação da bananeira .....	8
4.1 Método de Propagação convencional .....	9
4.2 Método de Propagação in vitro .....	10
5 Vírus que infectam a bananeira .....	14
5.1 <i>Cucumber mosaic virus</i> .....	15
5.2 <i>Banana streak virus</i> .....	19
5.2.1 BSV – Pararetrovírus de plantas (EPRVs) .....	22
6 Detecção de vírus de plantas .....	25
6.1 Métodos Sorológicos .....	26
6.2 Métodos Moleculares .....	26
7 REFERÊNCIAS .....	30
Capítulo 2. Micropropagação in vitro de genótipos de bananeira e indexação para o <i>Cucumber mosaic virus</i> e <i>Banana streak virus</i> .....	37
1 INTRODUÇÃO .....	40
2 MATERIAL E MÉTODOS .....	42
2.1 Multiplicação in vitro de genótipos de bananeiras .....	44
2.2 Indexação das plantas micropropagadas .....	48
3 RESULTADOS E DISCUSSÕES .....	50
3.1 Análise estatística .....	56
3.2 Detecção sorológica do CMV por DAS–ELISA .....	57
4 CONCLUSÕES .....	59
5 REFERÊNCIAS .....	60

Capítulo 3. Caracterização molecular parcial de um isolado do <i>Cucumber mosaic virus</i> detectado em bananeiras no norte do Paraná .....	
1	INTRODUÇÃO ..... 65
2	MATERIAL E MÉTODOS ..... 67
2.1	Inoculação mecânica experimental do isolado viral obtido de bananeira ..... 67
2.2	Detecção e identificação do isolado viral obtido de bananeira pelo teste sorológico DAS–ELISA ..... 68
2.3	Identificação molecular do isolado viral ..... 69
2.3.1	Extração do RNA total de plantas ..... 69
2.3.2	Reação de Transcrição Reversa (RT) ..... 70
2.3.3	Reação de PCR ..... 71
2.4	Sequenciamento do produto de amplificação por RT-PCR ..... 72
3	RESULTADOS E DISCUSSÕES ..... 73
3.1	Inoculação mecânica experimental do isolado viral ..... 73
3.2	Detecção e identificação do isolado viral por meio do teste sorológico DAS– ELISA ..... 75
3.3	Identificação molecular do isolado viral ..... 76
3.3.1	Extração do RNA total de plantas de bananeiras ..... 76
3.4	Sequenciamento do produto de amplificação por RT-PCR ..... 78
4	CONCLUSÕES ..... 81
5	REFERÊNCIAS ..... 82
Capítulo 4. Detecção e caracterização molecular parcial do <i>Banana streak virus</i> isolado de bananeiras cultivadas no norte do Paraná .....	
1	INTRODUÇÃO ..... 86
2	MATERIAL E MÉTODOS ..... 88
2.1	Detecção sorológica do BSV por DAS–ELISA ..... 88
2.2	Detecção molecular do BSV ..... 89
2.2.1	Extração do DNA total de plantas de bananeiras ..... 89
2.2.2	Reações de PCR ..... 89
2.2.3	Amplificação por círculo rolante (RCA) do genoma do BSV ..... 91
2.3	Clonagem de um dos produtos de RCA obtido após reações de restrição enzimática..... 93

2.3.1	Extração do DNA plasmidial .....	94
2.4	Sequenciamento e identificação do isolado <i>Banana streak virus</i> .....	95
3	RESULTADOS E DISCUSSÕES .....	96
3.1	Detecção sorológica do BSV por DAS-ELISA .....	73
3.1.1	Detecção simples e mista do CMV e BSV por meio do teste DAS-ELISA .....	97
3.2	Detecção Molecular do BSV .....	98
3.2.1	Reações de PCR .....	98
3.2.2	Amplificação por círculo rolante (RCA) .....	102
3.3.	Comparação de métodos de detecção do BSV em amostras de bananeiras .....	105
3.4.	Sequenciamento para identificação viral .....	107
4	CONCLUSÕES .....	111
5	REFERÊNCIAS .....	112

## INTRODUÇÃO GERAL

No Brasil, a banana se destaca como a segunda fruta mais importante em área colhida, quantidade produzida, valor de produção e consumo, caracterizando assim, a cultura como de grande importância econômica para o país (BORGES; SOUZA, 2004).

No Paraná, junto com a expansão das áreas de plantio, tem havido uma demanda por mudas de bananeiras de alta qualidade, entretanto, não existe atualmente no estado disponibilidade desse material de plantio. A qualidade do material propagativo que tem sido utilizado, muitas vezes, é de qualidade duvidosa, aumentando, deste modo, o risco de incidência de pragas, doenças e podendo, no futuro, resultar em baixo rendimento dos cultivos. Alguns agricultores do norte do estado estão trocando a soja pela banana e a região já responde por 30% das cerca de 350 mil toneladas da fruta produzida no estado anualmente.

A produção de mudas de bananeira através da micropropagação vegetativa tem apresentado amplo desenvolvimento nos últimos anos em diversos países. No Brasil, a demanda por mudas de bananeira de qualidade tem aumentado, tanto para a renovação dos bananais de regiões produtoras, como também em áreas novas. Com isso houve a expansão dos laboratórios de micropropagação no país (SALERNO; ZAFFARI, 1999).

A micropropagação tem possibilitado a produção de mudas superiores e livres de doenças, como o mal-do-panamá (*Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*), o moko (*Pseudomonas solanacearum*), e nematoses como a causada pelo nematoide cavernícola (*Radopholus similis*) (SOUZA, 1994).

Na bananicultura, as doenças ocasionadas por vírus merecem atenção especial devido às dificuldades normalmente encontradas na sua correta identificação. Os vírus podem ser transmitidos por insetos vetores e através da propagação vegetativa, o que pode ocasionar uma ameaça à produção, tanto nas áreas onde os vírus são endêmicos, quanto naquelas livres de vírus, mas que recebem novas mudas.

Até o momento, o vírus do mosaico do pepino (*Cucumber mosaic virus*, CMV), gênero *Cucumovirus* e o vírus das estrias da bananeira (*Banana streak virus*, BSV), gênero *Badnavirus*, foram registrados em bananeiras cultivadas no Brasil (MEISSNER; BRIOSO, 2000).

As bananeiras podem ser infectadas por mais de um vírus ao mesmo tempo (BRIOSO et al., 2000). Estudos demonstraram que bananeiras infectadas com o BSV apresentam sintomas que podem ser muitas vezes confundidos com aqueles causados pelo

CMV, sendo, deste modo, indistinguíveis os sintomas causados pela dupla infecção destes vírus. No caso da infecção pelo BSV, as plantas infectadas podem apresentar sintomas de estrias foliares, lesões foliares cloróticas, mosaico, má formação dos frutos e diminuição do cacho. Já as plantas infectadas pelo CMV podem apresentar sintomas de necrose vascular, espessamento intermitente da nervura, separação da bainha foliar externa do pseudocaule, clorose, mosaico, nanismo, má formação dos frutos e, às vezes, morte do vegetal (FIGUEIREDO; BRIOSO, 2007).

Em vista dos problemas fitossanitários causados por estes vírus, um crescente comércio de mudas de bananeira micropropagadas tem se estabelecido, visando a limpeza clonal das cultivares de maior interesse econômico. Com isso, o presente trabalho tem como objetivo padronizar um protocolo de micropropagação *in vitro* para as variedades de bananeira, Grand Naine, Nanicão comum, Jangada e IAC 2001, pertencentes ao grupo Cavendish, cultivadas no Paraná, e indexá-las para o CMV e BSV. Detectar sorologicamente e através da PCR a presença do CMV e do BSV em amostras colhidas em áreas de produção da região Norte do Paraná, visando a caracterização molecular parcial dos isolados virais identificados.

## CAPÍTULO 1

### Revisão bibliográfica

## 1. A cultura da bananeira (*Musa spp.*)

Segundo Castro et al. (2008), a maioria das cultivares de bananeira (*Musa spp.*) originaram-se no Sudoeste Asiático, tendo referências da sua presença na Índia, Malásia ou Filipinas, e foram cultivadas há mais de 4.000 anos. Também existem outros centros de origem secundários como África Oriental e ilhas do Pacífico, além de um importante centro de diversidade na África Ocidental. Porém, não se pode indicar com exatidão a origem da bananeira, pois ela se perde na mitologia grega e indiana.

A bananeira, originária do Pacífico e da Ásia, foi provavelmente a primeira fruteira a ser cultivada pelo homem. A bananeira foi descrita no século 18, pelo botânico sueco Lineu, como *Musa sapientum*. Da família das *Musaceas*, é cultivada em todos os estados brasileiros, desde a faixa litorânea até os planaltos do interior (OLIVEIRA, 2010).

Por ser uma planta tipicamente tropical, a bananeira exige, para um bom desenvolvimento, calor constante, elevada umidade e boa distribuição de chuvas durante o ano, sendo estas condições encontradas na faixa que compreende os paralelos de 30° de latitude norte e sul, com temperaturas situadas entre os limites de 15°C e 35°C (MOREIRA, 1987). Devido a sua ampla adaptação, é cultivada em quase todos os países tropicais, e no Brasil é cultivada de norte a sul, envolvendo desde o litoral até os planaltos do interior (DANTAS; SOARES, 2000).

No Brasil, praticamente toda a produção de banana é consumida *in natura* e o seu cultivo tem papel fundamental na fixação da mão-de-obra rural. São industrializados cerca de 2,5 a 3,0% da produção, sendo 33% desses produtos consumidos no mercado interno, na forma de purê (principal produto), bananada, banana-passa, balas, geléias, fruta em calda, fruta cristalizada, entre outros (FOLEGATTI; MATSUURA, 2004).

A banana constitui elemento importante na alimentação de populações de baixa renda, não só pelo alto valor nutritivo, mas também pelo baixo custo. Sabe-se que uma única banana supre cerca de um quarto da quantidade de vitamina C recomendada diariamente para crianças (OLIVEIRA, 2010).



## **2. Importância socioeconômica da banana no mundo e no Paraná.**

A banana é uma das frutas mais importantes do mundo, tanto no que se refere à produção quanto à comercialização, estando presente em mais de 120 países e destacando-se como a fruta mais consumida no mundo.

Em 2010, a produção mundial de banana foi de aproximadamente 102 milhões de toneladas, sendo a Índia o maior produtor com 31,9 milhões de toneladas, seguido respectivamente pela China, Filipinas, Equador e Brasil (IBGE, 2012).

A produção brasileira de banana em 2010 foi de aproximadamente 6.962.792 toneladas, em uma área plantada de 486.991 hectares, com rendimento médio de 14.298 kg/hectare, colocando o Brasil como quinto maior produtor de banana (IBGE, 2012). Quase a totalidade dessa produção é consumida pelo mercado interno, tendo em vista que a banana é a fruta com maior consumo anual per capita alcançando 34,5 kg/hab/ano. No Brasil se destacam os estados da Bahia, São Paulo, Ceará, Minas Gerais, Santa Catarina e Rio Grande do Norte como os principais produtores (FOLEGATTI; MATSUURA, 2004).

O seu cultivo é uma das atividades agrícolas mais antigas do nosso país, merecendo destaque em todos os estados brasileiros. Porém, entre os fatores que afetam a cultura, os climáticos, como temperatura e precipitação, podem limitar o cultivo, favorecendo a concentração da cultura nos estados de São Paulo, Bahia, Pará, Santa Catarina e Minas Gerais (BORGES et al., 2006).

A maior parte da produção provém do Nordeste do país, onde é produzido 38,05% do volume total nacional, seguido das Regiões Sudeste com 31,97%, Sul com 14,69%, Norte com 11,70% e Centro-Oeste 3,58%. O maior estado produtor é São Paulo com 1.231.823 toneladas de bananas; já o estado do Paraná se situa em oitavo lugar na produção nacional com 237.267 toneladas (IBGE, 2012).

Em 1545, já havia pequenos plantios de bananas no Litoral do Paraná, junto aos engenhos de cana de açúcar. Porém, somente no final do século XIX, a bananicultura se tornou o produto agrícola mais importante na região, tendo em 1904 exportado 18 mil cachos e, em 1907, a quantidade de quase 700 mil cachos para outros países da América do Sul (MOREIRA; CORDEIRO, 2006).

A economia agrícola do Paraná desde 1970 se encontra baseada num ciclo econômico de produção de grãos e cereais. A fruticultura, aproveitando-se das áreas de transição climática e dos vários tipos de solo, possui importância significativa para alguns

municípios e regiões, onde uma diversidade de espécies de frutas é cultivada. Alguns agricultores do norte do estado estão trocando a soja pela banana e a região já responde por 30% das cerca de 350 mil toneladas da fruta produzida no estado anualmente (EMATER-PR, 2007).

O estado do Paraná produziu 237.267 toneladas em 2010, em uma área plantada de aproximadamente 10.281 hectares (IBGE, 2012). O município de Andirá, no norte do estado, já é o segundo maior produtor de banana do Paraná, atrás somente de Guaratuba, no litoral, que produz cerca de 90 mil toneladas por ano. Na sua busca atual por diversificação agrícola, a opção tem sido a fruticultura e a novidade é o cultivo da banana, uma vez que o município tem todas as condições de desenvolver a atividade pelo seu solo de alta fertilidade, clima e temperaturas favoráveis, condições que se repetem em outros municípios do noroeste do estado, como Maringá e Paranavaí (SEAB, 2008).

O grande crescimento da bananicultura ocorrido nos últimos anos no Paraná tem acarretado uma forte demanda por mudas, muitas vezes de origem duvidosa, aumentando deste modo o risco de incidência de pragas e doenças. Isso pode, no futuro, resultar em baixo rendimento dos cultivos.

### **3. Classificação botânica, morfologia e evolução da bananeira**

A bananeira é uma planta monocotiledônea, herbácea, com caule subterrâneo (rizoma) de onde saem as raízes primárias, possuindo um sistema radicular fasciculado. Apresenta um pseudocaule formado por bainhas foliares. A inflorescência sai do centro da copa, com brácteas ovaladas, de cujas axilas saem as flores, de cada conjunto de flores formam-se as pencas, de 7 a 15, com número variado de frutos de 40 a 220, dependendo da variedade (BORGES et al., 2006).

As plantas de bananeiras produtoras de frutos comestíveis seguem a sistemática botânica de classificação hierárquica, as quais se enquadram na classe das *Monocotyledoneae*, ordem *Scitaminales*, família *Musaceae*, fazendo parte as subfamílias *Heliconioideae*, *Strelitzioideae* e *Musoideae*. Na subfamília *Musoideae*, é encontrado o gênero *Musa*, constituído por quatro séries ou seções: *Australimusa*, *Callimusa*, *Rhodochlamys* e (Eu-) *Musa*. O gênero *Musa* tem duas espécies, a *Musa ingens* (2n=14) e *Musa becarii* (2n=18). A seção (Eu-) *Musa* é a mais importante, por ter o maior número de espécies do gênero,

apresentar ampla distribuição geográfica e por abranger as espécies comestíveis (ALVES, 1999).

O gênero *Musa* segue a classificação baseada no número básico de cromossomos e é dividido em dois grupos: o primeiro é o das espécies com  $n = 10$  cromossomos e pertencem às seções *Australimusa* e *Callimusa*; já o segundo o das espécies com  $n = 11$  cromossomos integram as seções *Rhodochlamys* e (Eu-) *Musa* (DANTAS; SOARES, 2000).

A maioria das cultivares de banana evoluiu a partir das espécies diplóides selvagens *M. acuminata* e *M. balbisiana*, apresentando três níveis cromossômicos distintos: diplóide, triplóide e tetraplóide, que correspondem a respectivamente dois, três e quatro múltiplos do número básico, ou seja, genoma de 11 cromossomos ( $x = n$ ). Por outro lado, a origem de bananeiras triplóides, a partir de diplóides, e de tetraplóides, a partir de triplóides, é constatada por meio de cruzamentos experimentais (DANTAS; SOARES, 2000).

As bananeiras que produzem frutos comestíveis evoluíram principalmente a partir das duas espécies selvagens citadas anteriormente, ou seja, a *M. acuminata* e *M. balbisiana*. Cada cultivar deve conter combinações variadas de genomas completos das espécies parentais, sendo os genomas denominados pelas letras A (*M. acuminata*) e B (*M. balbisiana*), de cujas combinações resultam os grupos AA, BB, AB, AAA, AAB, ABB, AAAA, AAAB, AABB e ABBB (ALVES, 1999).

A evolução das espécies processou-se em quatro etapas: na primeira etapa, tem-se a ocorrência da partenocarpia por mutação em *M. acuminata* (AA), a qual tem a capacidade de gerar polpa sem a produção de sementes; na segunda etapa, ocorreu a hibridação entre cultivares do grupo AA e plantas selvagens de *M. balbisiana* (BB), produzindo híbridos diplóides do grupo AB, hoje raros e possivelmente limitados à Índia; enquanto que na terceira e quarta etapas, temos capacidade de várias bananeiras e alguns híbridos de apresentar a capacidade de gerar, em baixa frequência, células-ovo viáveis, sem meiose típica, com a mesma constituição cromossômica e genética da planta-mãe, seja esta diplóide ou triplóide. Devido à ocorrência de cruzamentos espontâneos envolvendo pólen das espécies parentais (*M. acuminata* e *M. balbisiana*) ou de cultivares do grupo AA, com genótipos dos grupos AA e AB, foi possível a evolução de triplóides dos grupos AAA, AAB e ABB, pela adição do número básico  $x$  (A ou B). Assim como os tetraplóides dos grupos AAAA, AAAB, AABB e ABBB evoluíram a partir dos três grupos triplóides (DANTAS; SOARES, 2000).

No Brasil, as variedades mais difundidas e utilizadas para o mercado interno são: Prata, Pacovan, Prata Anã, Maçã, Mysore, Terra e D'Angola, estas são do grupo AAB.

Enquanto que, entre as utilizadas para a exportação sobressaem a Nanica, Nanicão, Williams e Grande Naine, do grupo Cavendish (AAA) (BORGES et al., 2006). Como o mercado internacional prefere a banana Cavendish, devido à maior aceitação no mercado e à produtividade média ser o dobro da banana tipo ‘Prata’, dificilmente os produtores do tipo ‘Prata’ conseguirão conquistar espaço nesse mercado (ALMEIDA et al., 2001). Em menor escala são plantadas a ‘Ouro’ (AA), a ‘Figo Cinza’ e ‘Figo Vermelho’ (ABB), ‘Caru Verde’ e ‘Caru Roxa’ (AAA). As variedades Prata, Prata Anã e Pacovan são as responsáveis por aproximadamente 60% da área cultivada no Brasil (BORGES et al., 2006).

#### **4. Métodos de propagação da bananeira**

A bananeira apresenta dois métodos de propagação, o sexuado, que é frequentemente utilizado na obtenção de novas variedades, ou para o melhoramento genético, e o assexuado ou vegetativo, com a produção de mudas. Normalmente, as bananeiras são propagadas vegetativamente por meio de mudas desenvolvidas a partir de gemas do seu caule subterrâneo ou rizoma, através da separação do rizoma da planta-mãe. Porém, o ideal é que estas mudas sejam adquiridas de viveiros, que são áreas destinadas à produção exclusiva de mudas de boa qualidade (SOUZA et al., 2000).

Segundo Soto Ballesterero (1992), o viveiro deve ser localizado próximo ao bananal para permitir um transporte rápido das mudas, além de ser eficiente e de baixo custo. As mudas a serem propagadas devem receber um processo de saneamento e seleção e apresentar um peso inferior a 2 kg, devendo os rizomas originar-se de filhos de alta vitalidade e de aparência normal.

Na ausência dos viveiros, as mudas devem ser adquiridas de um bananal com plantas bem vigorosas, em ótimo estado fitossanitário, com idade inferior a quatro anos, que não apresente mistura de variedades e a presença de plantas daninhas de difícil erradicação (SOUZA et al., 2000).

Segundo Cordeiro e Mesquita (2000), as mudas de bananeira podem ser produzidas por meio de quatro métodos diferentes, sendo eles, o método convencional, o método de fracionamento do rizoma, método *in vitro* e o método por ferimentos de gemas.

#### 4.1. Método de Propagação convencional

No método convencional de propagação, são utilizadas mudas de bananeira provenientes das gemas vegetativas, que brotaram do rizoma e que são separados da planta mãe, os quais, por replantio, perpetuam a espécie. Assim, uma bananeira produz mudas até o surgimento do cacho e essa produção é influenciada pela variedade da bananeira, pelo seu porte e pela idade da planta-mãe, podendo produzir de nove a dez mudas em um período geralmente superior a 12 meses, em condições de campo, e nem todas são de boa qualidade (ALVES et al., 2004). Por outro lado, Souza et al. (2000) ressaltam que um rizoma pode produzir aproximadamente 40 ou mais brotos, porém sem desenvolvimento satisfatório de todos.

Na propagação convencional, as mudas adquiridas encontram-se, em geral, em diferentes estádios de desenvolvimento ou tamanho, recebendo uma denominação que as diferencia, permitindo a identificação dos diferentes tipos existentes, como: chifrinho (mudas de 20 a 30 cm de altura); chifre (mudas de 50 a 60 cm de altura); chifrão (mudas de 60 a 150 cm de altura); adulta (mudas com rizomas bem desenvolvidos, com folhas largas); pedaço de rizoma (muda do fracionamento do rizoma, com no mínimo uma gema intumescida); rizoma com filho aderido muda de grande peso); e guarda-chuva ou orelha de elefante (mudas pequenas e com rizomas diminutos, mas com folhas típicas de plantas adultas) (SOUZA et al., 2000) (Figura 1).

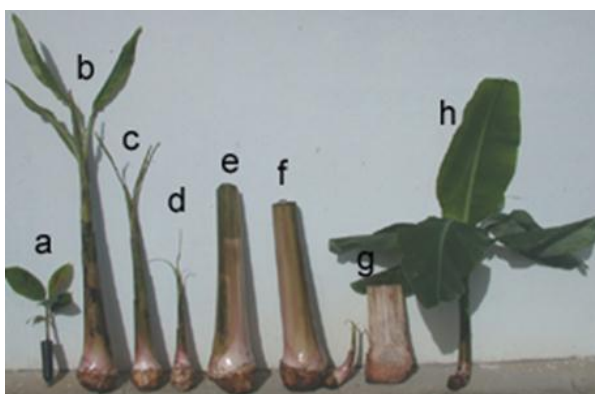


Figura 1. Tipos de mudas de bananeiras micropropagadas (a); tipo chifrão(b); tipo chifre (c); tipo chifrinho (d); rizoma de planta adulta (e); rizoma com filho aderido (f); pedaço de rizoma (g); e muda tipo guarda-chuva (h), segundo Santos-Serejo et al. (2006).

Segundo Silva et al. (1999), no sistema convencional, são retiradas mudas de bananais em produção na forma de “chifrinho” e “chifre”. Para a propagação da bananeira, as mudas do tipo chifrão são as ideais, devido a uma série de fatores: alto vigor, elevada porcentagem de pegamento das mudas, rápido crescimento, facilidade no transporte e manejo, produção de cachos grandes, uniformes e com frutos de excelente qualidade (ALVES et al., 2004). Cordeiro e Mesquita (2000) sugerem o uso de mudas do tipo chifre ou chifrão, devido à boa quantidade de reserva, o que proporciona maior resistência às condições adversas após o plantio.

Estudos realizados por Souza et al. (2000) indicam que o sistema de propagação convencional é muito lento, apresenta baixa taxa de multiplicação, desuniformidade na produção de mudas, dificultando o manejo do bananal e ainda permite a disseminação de pragas e doenças para novas áreas, como o Mal do Panamá, broca, nematose, viroses, moko e podridão mole. Com isso, novos métodos de propagação começaram a ser desenvolvidos e utilizados, de modo a elevar a taxa de multiplicação e a incrementar a produção de mudas de qualidade (ALVES et al., 2004).

Dentre os métodos de propagação da bananeira, temos o Fracionamento do Rizoma, que devido à sua simplicidade, pode ser utilizado para qualquer variedade de bananeira. A técnica consiste no fracionamento do rizoma em pedaços de acordo com a quantidade de gemas existentes. Estas são plantadas em canteiros, para germinação, e de 4 a 6 meses as mudas estarão aptas para serem transferidas para o campo (SOUZA et al., 2000). Embora esse método proporcione uma multiplicação mais rápida que o convencional, não é muito efetivo quanto a sanidade e uniformidade (ALVES et al., 2004).

Outro método utilizado é a Propagação Acelerada *in vivo*, que se baseia na quebra da dominância apical, estimulando o desenvolvimento das gemas laterais do rizoma. E pode utilizar para esse processo reguladores de crescimento, como o benzilaminopurina (BAP). O método tem rendimento de 20 a 50 mudas por rizoma, em um período de 5 a 7 meses. Entretanto, tem como desvantagem a necessidade de adequada infraestrutura como casa de vegetação e telado, cujo custo é relativamente elevado (MENDONÇA et al. 2003).

#### **4.2. Método de Propagação *in vitro***

Uma das necessidades na bananicultura é a produção de mudas de boa qualidade fitossanitária, uniformes e em grande escala. Para isso, a micropropagação ou propagação *in*

*in vitro*, com ápices caulinares, gemas laterais e gemas florais, tem sido utilizada em muitos países. No Brasil, esta metodologia vem crescendo mediante a instalação de diversos laboratórios comerciais, instalados em varias regiões do país permitindo assim, um acesso mais rápido dos produtores às mudas de melhor qualidade, principalmente das variedades tradicionais e de novos híbridos desenvolvidos pelos programas de melhoramento genético (ALVES et al., 2004).

A primeira aplicação do cultivo *in vitro* de Musa foi relatada por Cox et al. (1960), com o sucesso da cultura de embriões somáticos. Esta técnica *in vitro* foi desenvolvida para superar a germinação geralmente baixa e irregular das sementes de bananeira. Berg e Bustamante, em 1974, utilizaram o tratamento térmico com a cultura de meristema *in vitro* para a erradicação do *Cucumber mosaic virus* (CMV) em bananeiras.

Segundo Banerjee e De Langhe (1985), as técnicas de propagação *in vitro* de bananeira foram desenvolvidas no início da década de 1980. A propagação geralmente envolve o desenvolvimento *in vitro* de brotos a partir de gema (ápices caulinares), sendo induzida a formação de novas gemas (ALVES et al., 2004). O cultivo é feito em meio artificial, com nutrientes necessários para o crescimento e desenvolvimento das gemas e sob condições de luminosidade, temperatura e fotoperíodo totalmente controlados, em laboratório.

É fundamental para o sucesso da micropropagação a escolha do explante, ou seja, do segmento da planta que será utilizado para o estabelecimento da cultura *in vitro*, sendo que, várias fontes de explantes têm sido utilizadas, como muda do tipo chifrinho, rizoma e inflorescência masculina. Os rizomas a serem coletados para a micropropagação podem ser retirados de plantas cultivadas no campo, de mudas produzidas pelo método convencional ou por micropropagação. Porém para os rizomas obtidos de mudas micropropagadas, é recomendado que, antes da coleta, as plantas tenham sido cultivadas, pelo menos, durante três ciclos sucessivos e que mantenham boas características de produção e de fitossanidade (CARVALHO et al., 2012).

Na micropropagação da bananeira, a citocinina benzilaminopurina (BAP) é o regulador de crescimento mais eficiente para induzir brotações. As citocininas são indispensáveis para quebrar a dominância apical e induzir a proliferação de gemas axilares (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998). Os subcultivos podem ser realizados em intervalos de 20 a 30 dias, aumentando em cerca de cinco vezes o número de brotos formados a cada subcultivo.

O número de subcultivos, o genótipo, o tipo de explantes, e os componentes do meio de cultura, têm influência direta sobre a estabilidade genética das plantas regeneradas, pois, quanto maior o número de subcultivos, maior a chance de ocorrer variação somaclonal. Com isso, a realização de até cinco subcultivos é considerada uma margem segura de multiplicação (ALVES et al., 2004).

Santos e Rodrigues (2004) revelaram, por meio de seus resultados, que para a obtenção de mudas de bananeira da cultivar *Pacovan* (AAB), os ápices caulinares devem ser micropropagados em até cinco subcultivos para gerar plantas sem variação somaclonal.

Na Tabela 1, pode-se observar a comparação entre os métodos de propagação convencional, fracionamento do rizoma, propagação rápida *in vivo* e propagação *in vitro* (micropropagação). Constata-se, por essa comparação, que a obtenção de mudas via micropropagação é superior aos outros métodos; Enquanto que a propagação convencional produz cerca de 10 a 30 mudas em um período de 12 meses, a micropropagação *in vitro* pode produzir cerca de dez vezes mais em metade do tempo (ALVES et al., 2004).

Tabela 1. Comparação entre o número de mudas e o tempo necessário para a obtenção de plantas nos diferentes métodos de propagação vegetativa.

Métodos	Número de mudas	Período (meses)
Convencional	20 a 30 mudas/planta	12
Fracionamento do rizoma	4 a 12 mudas/planta	4-6
Propagação rápida <i>in vivo</i>	20 a 50 mudas/planta	5-7
Propagação <i>in vitro</i>	150 a 300 mudas/planta	6-8

Fonte: Alves et al., 2004.

As vantagens da propagação *in vitro* são: produção e clonagem em grande escala de plantas em qualquer época do ano e com economia de tempo e espaço; uniformidade no desenvolvimento das mudas, proporcionando uniformização no plantio e sincronização da colheita; obtenção de mudas com características genéticas idênticas a planta matriz, podendo apresentar maior precocidade no primeiro ciclo de produção em relação às mudas convencionais, além de serem mais precoces na emissão de brotações por ano; as mudas multiplicadas produzem cerca de 30 % a mais do que as convencionais, por serem obtidas de plantas selecionadas e estarem livres de doenças sistêmicas, evitando a disseminação de pragas e doenças; as mudas sobrevivem mais no campo e crescem mais rapidamente nos primeiros estádios de desenvolvimento, além de proporcionarem colheitas superiores a das plantas oriundas da propagação convencional (ALVES et al., 2004).



Alves et al. (2004) resumiram a micropropagação em seis etapas. A primeira etapa se baseia na escolha do material vegetativo, nas quais várias fontes de explantes têm sido utilizadas, como ápices caulinares, gemas laterais e gemas florais. Porém a micropropagação por ápice caulinar, que é o meristema envolto por alguns primórdios foliares e que contém pequeno segmento de rizoma, tem sido a mais utilizada para a bananeira e também para outras espécies vegetais.

A segunda etapa refere-se ao preparo do material e à sua desinfestação com a utilização de lavagens com água estéril, álcool 70%, e hipoclorito de sódio. Esta etapa é muito importante para evitar a contaminação por fungos e bactérias. A terceira etapa compreende o isolamento da gema e estabelecimento da cultura, no qual os explantes passam por sucessivas reduções até atingir o tamanho desejado. São inoculados em meio de cultura de estabelecimento, que contém soluções salinas (macro e micronutrientes), do meio MS, suplementado com vitaminas, sacarose, ágar e reguladores de crescimento. Posteriormente, temos a etapa de proliferação de brotos, sendo induzida a formação de brotos do explante utilizando reguladores de crescimento.

Após o estabelecimento, crescimento e brotações dos explantes, a próxima etapa compreende o enraizamento *in vitro*, que ao final do quinto subcultivo, os brotos são transferidos para o meio de enraizamento, sem adição de reguladores de crescimento. Na sexta e última etapa, ocorre a aclimação em casa de vegetação das plantas. Após estas apresentarem bom enraizamento são transferidas para tubetes e aclimatadas em casa de vegetação para atingirem o desenvolvimento adequado.

#### **4.2.1. Variação Somaclonal**

Na micropropagação *in vitro*, há ocorrência da variação somaclonal, ou seja, o aparecimento de plantas anormais, durante a multiplicação, com relação à estatura, cor, forma e arquitetura das folhas, e má formação dos cachos, podendo causar prejuízos à produção (ALVES et al., 2004). Porém, o aparecimento dessa variação entre as plantas se tornou útil na geração de variabilidade genética, possibilitando a seleção de plantas variantes (ZONETTI et al., 2003).

Na cultura da bananeira, os variantes somaclonais foram detectados primeiramente em 1972, por Ma e Shii, sendo os mais comuns com relação ao porte da planta, variando de baixo porte até gigantismo. Plantas com porte baixo podem ser de grande utilidade para as

práticas dos produtores, como facilidade dos tratos culturais e colheita e redução das perdas por tombamentos em áreas de ventos fortes. Porém, estas podem apresentar características negativas, como cachos pequenos, baixa produtividade e baixa qualidade do fruto (ZONETTI et al., 2003).

O fenômeno da chamada variação somaclonal é uma variação fenotípica de origem genética, ou seja, uma variação cromossômica, herdável nas gerações posteriores, ou epigenética, que é uma variação transitória entre somaclones (soma=vegetativo; clone=cópia idêntica), devido ao estresse fisiológico que a planta sofre quando submetida à micropropagação *in vitro* (GUIMARÃES et al., 2009).

Conhecer os mecanismos que causam a variação somaclonal e os procedimentos para evitar sua ocorrência, bem como os métodos para detecção precoce são fatores fundamentais para a produção de mudas micropropagadas com qualidade e segurança (ALVES et al., 2004).

Dentre os métodos utilizados para a detecção de variação somaclonal, pode-se destacar o acompanhamento visual e *roguing* durante o desenvolvimento das plantas, a análise citogenética e o uso de marcadores moleculares, como RAPD-*Random Amplified Polymorphic DNA*, SCAR-*Sequence Characterized Amplified Regions*, IRAP-*Inter-Retrotransposon Amplified Polymorphism* e SAMPL-*Selective Amplification of Microsatellite Polymorphic Loci*, entre outros (SANTOS-SEREJO et al., 2006).

Segundo Santos e Rodrigues (2004), como a porcentagem de variação somaclonal aumenta com o número de subcultivos, as biofábricas devem limitar os subcultivos para a obtenção de mudas de alta qualidade genética.

## **5. Vírus que infectam a bananeira**

Na cultura da bananeira, as doenças constituem uma grande preocupação devido ao elevado nível de perdas causadas por elas. Os problemas fitossanitários, como os causados por fungos, bactérias, nematóides e vírus, podem causar grandes perdas na cultura da bananeira. As viroses podem comprometer de forma significativa a produtividade e a viabilidade econômica da cultura (SILVA NETO; SILVA, 2009).

Mundialmente são encontrados seis vírus infectando a bananeira: o *Banana bunchy top virus* (BBTV), gênero *Babuvirus*, o *Cucumber mosaic virus*, gênero *Cucumovirus*, o *Banana streak virus* (BSV), gênero *Badnavirus*, o *Banana bract mosaic virus* (BBrMV), gênero *Potyvirus*, e o *Banana mild mosaic virus* (BanMMV), família *Flexiviridae* (FRISON;

SHARROCK, 1998). A distribuição desses vírus infectando bananeiras no mundo está demonstrada na Tabela 2.

Tabela 2. Virose, agente causal e distribuição geográfica dos vírus que infectam a bananeira.

Virose	Agente causal	Distribuição geográfica
<i>Banana bract mosaic</i>	<i>Banana bract mosaic virus</i>	Ásia
<i>Banana bunchy top</i>	<i>Banana bunchy top virus</i>	África, Ásia e Oceania
<i>Banana mosaic</i>	<i>Cucumber mosaic virus</i>	Todos os continentes
<i>Banana streak</i>	<i>Banana streak virus</i>	Todos os continentes
<i>Banana mild mosaic</i>	<i>Banana mild mosaic virus</i>	Todos os continentes
<i>Banana virus X</i>	<i>Banana virus X</i>	Guadeloupe

Fonte: Internacional Comittee on Taxonomy of Viruses – ICTV, 2013.

No Brasil, são descritos o CMV e o BSV (CORDEIRO et al., 2004). O monitoramento das viroses, mesmo as já existentes no país, é muito importante, uma vez que em diferentes regiões podem existir estirpes com diferente virulência e epidemiologia (MEISSNER FILHO; BRIOSO, 2000).

### 5.1. *Cucumber mosaic virus*

O *Cucumber mosaic virus* (vírus do mosaico do pepino) causa a doença conhecida como mosaico ou clorose infecciosa da bananeira, sendo um vírus cosmopolita ocorrendo em todo o território brasileiro (MEISSNER FILHO; BRIOSO, 2000). Historicamente, o CMV foi descrito em pepino no ano de 1916 por Doolittle e também em outras cucurbitáceas. Atualmente tem ocorrido no mundo inteiro, infectando mais de 1.200 espécies em mais de 100 famílias de monocotiledôneas e dicotiledôneas (ZITTER; MURPHY, 2009).

A doença na bananeira foi descrita em 1930 na Austrália (CORDEIRO et al., 2004) e tornou-se amplamente disseminada pelo mundo. Atualmente considera-se que seja encontrada em todas as áreas produtoras de banana (SILVA NETO; SILVA, 2009). A ocorrência do CMV em bananeira no Brasil foi descrita pela primeira vez em São Paulo por Silberschmidt e Nóbrega (1941), ocasionando mosaico, necrose e morte de bananeira. Posteriormente o CMV foi relatado nos Estados de Minas Gerais, Rio de Janeiro, Pernambuco, e Pará (EIRAS et al., 2001).

Mediante a realização de levantamentos da ocorrência do CMV em bananeira, foi observada a maior ocorrência nas cultivares do subgrupo Cavendish, infectando também os subgrupos Prata, Terra entre outros (MACIEL-ZAMBOLIM et al.,1994).

O CMV pertence à família *Bromoviridae*, que é composta por 6 gêneros, o *Alfamovirus* (1 espécie), *Anulavirus* (1 espécie), *Bromovirus* (6 espécies), *Cucumovirus* (4 espécies), *Ilarvirus* (19 espécies), e *Oleavirus* (1 espécie) e ao gênero *Cucumovirus*, o qual é sua espécie tipo (BUJARSKI et al., 2012).

O CMV possui partículas isométricas com diâmetro variando de 28 a 30 nm e apresenta um capsídeo composto por 180 subunidades protéicas com massa molecular de 24 kDa (PALUKAITIS et al., 1992).

O genoma do CMV contém três RNAs de fita simples, senso positivo, designados de RNA 1, RNA 2 e RNA 3, que são encapsidados em partículas individuais, além de um quarto segmento subgenômico. O RNA 1 contém 3357 nucleotídeos e codifica a proteína 1a de 111 kDa (ORF 1a), que é necessária para a replicação do genoma do vírus. O RNA 2, com 3050 nucleotídeos, codifica a proteína 2a de 97 kDa (ORF 2a), que está envolvida na replicação do vírus, e a proteína 2b de 15 kDa (ORF 2b), que está relacionada com a supressão do mecanismo de silenciamento gênico do hospedeiro, sendo responsável pela disseminação sistêmica e pela virulência do vírus. O RNA 3 codifica a proteína 3a, proteína de movimento (MP) com 30 kDa, requerida para o movimento do vírus de célula a célula e à longa distância, e a proteína da capa proteica de 24,5 kDa, a qual é traduzida a partir do RNA 4 subgenômico com 1034 nucleotídeos. Este RNA 4 é sintetizado a partir do RNA 3 (PALUKAITIS et al., 1992).

Segundo Roossinck (2002), um quarto RNA, denominado RNA 4A de 689 nucleotídeos, pode ser encontrado em algumas estirpes, em baixos níveis. Os RNAs genômicos apresentam uma estrutura denominada 5'CAP na extremidade 5' terminal, constituída por radicais 7-methyl guanosina, e uma porção altamente conservada na região 3' terminal, que pode formar uma estrutura como tRNA (Figura 2).

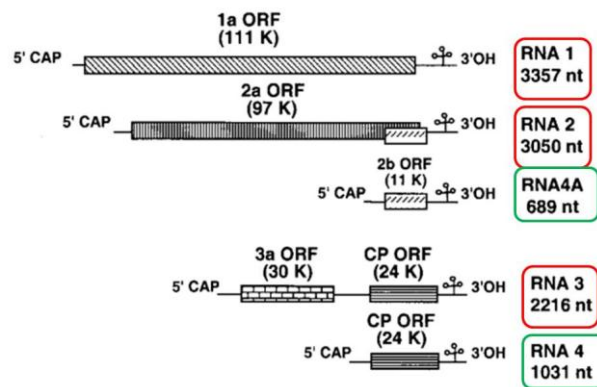


Figura 2. Organização genômica do CMV. Número de nucleotídeos (nt) e tamanho das proteínas codificadas, kDa (kilodaltons), segundo Roossinck (2002).

Segundo Aranda et al. (1993), alguns isolados de CMV podem apresentar um pequeno RNA, denominado de RNA satélite (satRNA), ou também RNA5, de 335 a 390 nucleotídeos, geralmente presente no subgrupo II, dependente do vírus para a sua replicação e encapsidação. Este RNA não codifica proteínas, mas pode alterar os sintomas induzidos pelo vírus (KAPER; WATERWORTH, 1977) e sua presença geralmente atenua os sintomas causados pelo CMV por afetar seu nível de replicação (PALUKAITIS et al., 1992). Porém, foi relatado na França um isolado de CMV encontrado em tomateiro, contendo um RNA satélite chamado CARNA 5, causando danos severos e necrose nas plantas infectadas (KAPER; WATERWORTH, 1977).

As estirpes de CMV foram divididas em dois subgrupos, o I e o II, com base nas propriedades sorológicas, na gama de plantas hospedeiras, na hibridação do ácido nucleico, na composição da sequência de proteína e/ou do ácido nucléico, análise do RNase H e análise por RT-PCR RFLP (ROOSSINCK, 2002). O subgrupo I é composto pelas estirpes Fny, M, C, D, O, Y; e o subgrupo II pelas estirpes WL e Q (WYLIE et al., 1993). Uma divisão adicional do subgrupo I em IA e IB foi proposta com base na análise da sequência de dados da região não traduzida 5' (NTR) do RNA 3, de várias estirpes e análise filogenética da proteína capsidial (CP). O subgrupo IB parece ser um ancestral do subgrupo IA, ou seja, um isolado do subgrupo IA provavelmente irradiado em um isolado do subgrupo IB (ROOSSINCK, 2002). Segundo Daniels e Campbell (1992), o subgrupo I foi dividido em IA e IB de acordo com a sensibilidade à temperatura, padrão de dsRNA e os sintomas em plantas indicadoras, como os observados em plantas de *Vigna unguiculata*, sendo mosaico sistêmico no subgrupo IA e lesão local necrótica no subgrupo IB. Eiras et al. (2004) utilizaram a técnica de RFLP-PCR

com enzimas de restrição *EcoRI*, *HindIII*, *BamHI* e *MspI* para diferenciar os isolados de CMV nos subgrupos I e II.

No Brasil, foram identificados isolados de CMV pertencentes ao subgrupo IA, em diferentes estados, confirmando assim, a prevalência desse subgrupo nas regiões de clima tropical e subtropical. Porém, foi identificada a estirpe IB (comum na Ásia) em plantas de pimentão do estado de Minas Gerais (EIRAS et al., 2004). Em bananeiras, Eiras et al. (2004), identificaram o CMV do subgrupo IA nos Estados de São Paulo, Minas Gerais e Pernambuco.

Singh et al. (1995) registraram a ocorrência de CMV em amostras de banana na Austrália, utilizando a técnica de RT-PCR combinada com as enzimas de restrição *EcoR I* e *MspI*. As amostras de bananeiras testadas estavam infectadas com isolado de CMV do subgrupo I. Mediante o sequenciamento, pode-se obter uma homologia de 98% com as sequências de CMV do subgrupo I, mas apenas 76% de homologia com as sequências de isolados de CMV subgrupo II.

As plantas de bananeiras infectadas com o CMV apresentam porte reduzido e os sintomas variam de ligeiras estrias amarelas sobre folhas velhas até severa necrose interna do pseudocaule, nanismo e morte da planta. Ao frutificar, a bananeira infectada apresenta frutos bem menores com desenvolvimento incompleto (BELALCAZAR CARVAJAL, 1991). Segundo Meissner Filho e Brioso (2000), podem ser encontrados na bananeira sintomas de mosaico nas folhas (áreas verde-escuras com áreas verde-claras), nervuras secundárias espessas, podendo ocorrer distorção foliar (Figura 3). Dependendo da estirpe e de temperaturas abaixo de 24°C, pode ocorrer necrose do pseudocaule e das folhas, e até mesmo morte da planta.



Figura 3. Sintomas de estrias amarelas cloróticas e distorção foliar induzidos pelo *Cucumber mosaic virus* em plantas de bananeiras provenientes da região de Andirá no Norte do Paraná.

O CMV é disseminado por mudas infectadas de bananeira e, naturalmente, de forma não persistente por mais de 60 espécies de afídeos, especialmente, *Aphis gossypii*, *Myzus persicae*, *Rhopalosiphum maidis* e *R. prunifoliae* (MEISSNER FILHO; BRIOSO, 2000; CORDEIRO et al., 2004). Porém, como a bananeira não é hospedeira desses pulgões, os prejuízos referem-se somente à transmissão do CMV, efetuada de maneira não persistente em breves picadas de prova, após a aquisição a partir de plantas infectadas (FANCELLI; MESQUITA, 2000). Diversas espécies de plantas daninhas são hospedeiras do CMV e, em bananais, geralmente a planta daninha trapoeraba (*Commelina diffusa*) é uma fonte de inóculo para a planta. O vírus é transmitido pelas sementes de algumas plantas hospedeiras (MEISSNER FILHO; BRIOSO, 2000).

## 5.2. *Banana streak virus*

O *Banana streak virus* agente causal da doença da folha estriada de bananeira ocorre na maioria das regiões produtoras de bananas do mundo (SILVA NETO; SILVA, 2009). Foi encontrado pela primeira vez infectando bananeira em 1966 na Costa do Marfim.

O vírus foi introduzido no Brasil e em outras regiões do mundo por meio da utilização de mudas infectadas, provavelmente pela introdução da variedade Mysore (MEISSNER FILHO; BRIOSO, 2000). No Brasil, a presença do BSV foi encontrada em diferentes cultivares, nos estados do Acre, Amazonas, Bahia, Ceará, Goiás, Minas Gerais, Piauí, Rio de Janeiro, Rondônia, Santa Catarina e em São Paulo (FIGUEIREDO et al., 2006).

Pertencente ao gênero *Badnavirus* e à família *Caulimoviridae*, é um vírus de DNA circular de fita dupla fechada, denominado de Pararetrovírus de planta (EPRVs) (GAYRAL et al., 2008). Esta família é dividida em sete gêneros de acordo com suas características morfológicas: *Caulimovirus* (9 espécies), *Soymovirus* (4 espécies), *Cavemovirus* (2 espécies), *Solendovirus* (2 espécies), *Petuvirus* (1 espécie), *Badnavirus* (25 espécies) e *Tungrovirus* (1 espécie) (GEERING; HULL, 2012), sendo encontrado nesta os vírus que se replicam por meio da transcrição reversa (STAGINNUS; RICHERT-PÖGGELER, 2006).

O BSV possui partículas baciliformes não envelopadas de tamanho  $30 \times 130 \pm 150$  nm, com genoma de DNA circular de fita dupla com tamanho aproximado de  $7.4 \pm 8.0$  kpb, sendo composto por três ORFs (*Open Reading Frames*) (Figura 4).

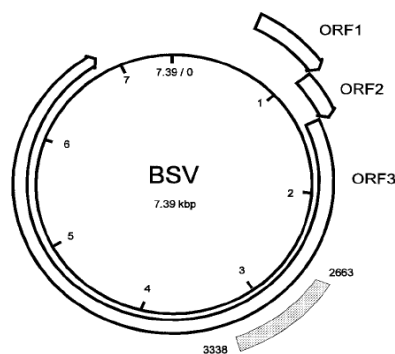


Figura 4. Organização do genoma do BSV. O círculo representa o genoma completo do DNA de fita dupla. O círculo interno mostra o mapeamento do transcrito de RNA. Os arcos exteriores indicam as posições das três regiões codificadoras (ORFs), segundo Harper e Hull (1998).

As ORFs 1 e 2 codificam duas proteínas pequenas, de 22 kDa e 14 kDa, respectivamente, de funções desconhecidas. A terceira ORF que codifica uma poliproteína de 210 kDa consiste de uma provável proteína de movimento célula a célula, proteína capsidial, protease aspártica e uma replicase viral, a qual possui funções de transcriptase reversa e ribonuclease H. Acredita-se, ainda, que esta poliproteína é clivada após sua transcrição em suas unidades funcionais pela protease aspártica (HARPER; HULL, 1998).

Quatro espécies distintas de BSV nomeadas como, *Banana streak MY (Mysore) virus* (BSMyV), *Banana streak OL virus* (BSOLV), *Banana streak GF virus* (BSGFV) e *Banana streak acuminata VN (Vietnam) virus* (BSVNV), são atualmente reconhecidas pelo Comitê Internacional para a Taxonomia de Vírus (ICTV - *International Committee on Taxonomy of Viruses*) (Tabela 3).

Tabela 3. Relação das espécies de *Banana streak virus* (BSV) reconhecidas pelo *International Committee on Taxonomy of Viruses* (ICTV) até 2012 e presença assinalada no Brasil.

Espécies de BSV	Sigla	Sequências disponíveis no NCBI*	Ocorrência no Brasil (até 2012)
<i>Banana streak GF virus</i>	BSGFV	Presente	Ausente
<i>Banana streak MY vírus</i>	BSMyV	Presente	?
<i>Banana streak OL vírus</i>	BSOLV	Presente	?
<i>Banana streak VN vírus</i>	BSVNV	Presente	Ausente

? – os dados parciais disponíveis são insuficientes para confirmar a presença ou ausência da mesma.  
 Fonte: Brioso, 2012



A tabela 4 relaciona alguns isolados de BSV cujas seqüências estão depositadas no GenBank, mas que ainda não foram reconhecidas como espécies pelo ICTV.

Tabela 4. Relação de isolados do BSV com seqüências depositadas no GenBank com algumas já constatadas no Brasil.

Possíveis espécies de BSV	Seqüências disponíveis no NCBI*	Ocorrência no Brasil (até 2012)
<i>Banana streak Brazil 2 virus</i> (BSBr2V)	Ausente	AM, CE
<i>Banana streak Brazil 3 virus</i> (BSBr3V)	Ausente	CE
<i>Banana streak CA virus</i> (BSCAV)	Presente	Ausente
<i>Banana streak Cavendish virus</i> (BSCV)	Presente	Ausente
<i>Banana streak IM virus</i> ( <i>Banana streak</i> <i>Imove vírus - BSImV</i> )	Presente	Ausente
<i>Banana streak PZ vírus</i> (BSPzV)	Ausente	AM
<i>Banana streak UA virus</i> (BSUAV)	Presente	Ausente
<i>Banana streak UB virus</i> (= <i>Banana streak Brazil 1 virus</i> )	Presente	Acre, Amazonas, Bahia, Ceará, Goiás, Piauí, Minas Gerais, Rio de Janeiro, Rondônia, Santa Catarina, São Paulo
<i>Banana streak UI virus</i> (BSUIV)	Presente	Ausente
<i>Banana streak UL virus</i> (BSULV)	Presente	Ausente
<i>Banana streak UM virus</i> (BSUMV)	Presente	Ausente

\* NCBI (*National Center of Biotechnology Information* - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)

Fonte: Brioso, 2012.

Os sintomas desta doença são altamente variáveis e podem ocorrer estrias cloróticas e necróticas ao longo da lâmina foliar, distorção das folhas e pecíolos, quebra do caule, desenvolvimento anormal do cacho e morte do ponto de crescimento (DAHALL et al., 2000) (Figura 5). Em alguns casos, as folhas emergentes podem permanecer assintomáticas (JAMES et al., 2011).

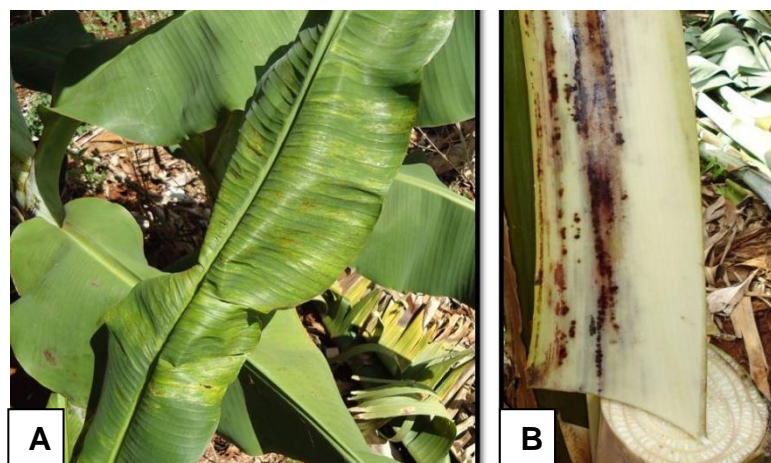


Figura 5. Sintomas do BSV em bananeira da variedade Jangada, de Andirá-PR. A: folhas com estrias cloróticas e necróticas ao longo da lâmina foliar e distorção foliar; B: manchas necróticas no caule.

O BSV é transmitido na natureza pelas cochonilhas *Planococcus citri* Russo e *Saccharicoccus sacchari* Ckll de forma semipersistente. Sua principal dispersão é através de material propagativo infectado, como os seus rizomas. Não é transmitido mecanicamente e é disseminado por meio de sementes e de plantas infectadas, ficando integrado ao genoma da planta hospedeira (JONES; LOCKHART, 1993).

### 5.2.1. BSV – Pararetrovirus de plantas (EPRVs)

Segundo Harper et al. (2002), um grande número de vírus infectam as plantas, porém, somente um pequeno número tem DNA de fita dupla como seu material genético. Existem dois grupos de vírus de DNA que infectam as plantas. Os que possuem DNA de fita simples (ssDNA) pertencentes a família *Geminiviridae*, que se replicam por meio de um mecanismo de círculo rolante, e os de DNA de fita dupla (dsDNA), da família *Caulimoviridae*, compreendendo os *Caulimovirus* e *Badnavirus*, que se replicam por transcrição reversa.

Segundo Staginnus e Richert-Poggeler (2006), os pararetrovirus endógenos de planta (EPRVs) foram identificados como parceiros integrados da maioria dos membros de vírus de plantas da família *Caulimoviridae* e representam elementos repetitivos que são onipresentes no reino vegetal. Eles são, muitas vezes, localizados em regiões pericentromérica do cromossomo da planta nas proximidades de sequências retrotransposon. Dependendo de sua

estrutura e integridade de seqüência, alguns EPRVs são capazes de se replicar e iniciar infecção viral.

Elementos transponíveis (transposons) e os vírus que usam a transcrição reversa para a replicação do genoma são referidos como retroelementos. Os retroelementos virais podem ocorrer em formas exógenas ou endógenas. Os Retrovírus, com RNA encapsidado, foram descritos em primeiro lugar em humanos; enquanto que os pararetrovirus de DNA de dupla fita (dsDNA) foram posteriormente identificados em plantas. Em contraste com os retrovírus, a integração no genoma do hospedeiro não é obrigatória para a replicação dos pararetrovirus. Assim, as características essenciais para a integração e replicação, particularmente a presença de integrase ou repetição terminal longa, não estão presentes em genomas de pararetrovirus (STAGINNUS; RICHERT-POGGELER, 2006).

Após a infecção, os pararetrovirus liberam o DNA circular viral dentro do núcleo da célula hospedeira, onde é convertido em DNA “superenovelado” e, associados com histonas, formam um minicromossomo. O DNA viral é, então, transcrito em mRNA, bem como RNA pré-genômico, que é usado para a replicação do DNA no citoplasma via transcrição reversa. Ao contrário dos retrovírus, a integração do genoma dos pararetrovirus no genoma da hospedeira não é necessário para a replicação viral. No entanto, a integração pararetroviral dentro do genoma da hospedeira existe e pode ter se originado a partir de recombinações ilegítimas durante a fase de minicromossomo. Esses integrantes, chamados de pararetrovirus endógenos (EPRVs), variam de pequenos fragmentos incompletos para seqüências maiores, os quais tornam-se parte do genoma da planta por meio da integração em uma célula germinal, tornando-se posteriormente fixos na população de plantas por meio das forças evolutivas da seleção natural e/ou deriva genética (GAYRAL et al., 2008).

Os EPRVs foram encontrados no genoma de diferentes espécies de plantas, como laranja azeda, batata, arroz, tomate, petúnia, tabaco e bananeira, podendo levar a epidemias, sendo, portanto, de importância econômica. Porém a descoberta de que alguns EPRVs poderiam liberar virions veio de observações da infecção viral espontânea em petunia pela *Petunia vein clearing virus* (PVCV), família *Caulimoviridae* e gênero *Petuvirus*, em tabaco por *Tabacco vein clearing virus* (TVCV), família *Caulimoviridae*, e em banana pelo *Banana streak virus* (GAYRAL et al., 2008).

Os EPRVs relacionados com o gênero *Badnavirus* só foram descritos na banana, nas diferentes espécies de *Musa*, particularmente as pertencentes ao genoma A (*Musa acuminata*)

e B (*Musa balbisiana*), abrigando distintas sequências de *Banana streak vírus*, alguns sendo chamados BEVs (vírus endógenos da Bananeira) (GEERING et al., 2005).

Na bananeira, foram descritos dois tipos de sequências integradas do BSV. O primeiro tipo contém a maioria dos EPRVs de bananeira e compreende o genoma incompleto do vírus que são incapazes de causar infecções. O segundo tipo de sequências integradas, conhecido como um BSV endógeno ativável (eaBSVs), consiste de genomas funcionais completos de BSVs episomais caracterizados que existem como várias regiões não contíguas do DNA do vírus, combinado com sequências genômica-hospedeiro o que pode causar infecção. Sob determinadas condições de estresse e particularmente a cultura de tecidos e a hibridação podem levar a ocorrência de eventos de recombinação nas sequências integradas, permitindo que o genoma viral reconstituído seja ativado, resultando assim, em infecções episomais (JAMES et al., 2011). Integrantes incompletos foram encontrados em ambos os genomas A e B derivados de progenitores selvagens domesticados de bananeira, *Musa acuminata* (A) e *M. balbisiana* (B), respectivamente, e os eaBSVs só foram detectados no genoma B dos acessos de bananeira (GEERING et al., 2001).

Estudos sobre o aparecimento do BSV após cruzamentos genéticos interespecíficos revelaram que pelo menos dois fatores estão envolvidos na expressão do BSV. O primeiro é a ploidia do genoma B em genótipos de *Musa*. Os genótipos diplóides de *M. balbisiana* (BB), que são utilizados como genitores femininos, abriga EPRVs de BSV infecciosos em seu genoma, mas são, no entanto, resistentes a qualquer multiplicação de BSV, seja a partir da ativação EPRV ou de infecção BSV exógena. Em contraste, os genótipos com genomas haplóides B abrigando EPRVs BSV, tais como os híbridos triplóides (AAB), provenientes de cruzamentos genético interespecíficos, assim como outros triplóides naturais ou tetraplóides recém-criados, podem expressar BSV após stresses e são suscetíveis a infecção por BSV. O segundo fator é genético e identificado em progênie triplóide (AAB) de cruzamentos genéticos interespecíficos entre diplóides *M. balbisiana* (BB) livres de vírus e tetraplóides *M. acuminata* (AAAA) (GAYRAL et al., 2008).

Existe a hipótese de que os EPRVs estejam envolvidos com o mecanismo de indução de resistência viral no hospedeiro. Assim, espécies que carregam EPRVs são frequentemente resistentes ao vírus correspondente. Esta hipótese poderia explicar porquê os EPRVs infectivos são mantidos por seleção natural em plantas, desde que tragam a resistência dependente de homologia (silenciamento gênico) (GAYRAL et al., 2008).

## 6. Detecção de vírus de plantas

O diagnóstico de uma doença é o primeiro passo para a definição de medidas de controle. Para algumas doenças, a causa pode ser determinada pelos sintomas, mas nem sempre isso é possível e, nesses casos, faz-se necessário recorrer a técnicas laboratoriais para atingir o diagnóstico correto (RODRIGUES, 1998). Em geral, qualquer método de detecção deve ser rápido e altamente específico para o vírus alvo. Além de detectar vírus presentes em baixas quantidades no tecido vegetal e em uma fase inicial de desenvolvimento da doença (RODRIGUES, 1998).

A detecção no campo das doenças causadas por vírus é dependente do avaliador e da sua familiarização com os sintomas característicos da virose, os quais podem ser confundidos com danos causados por ácaros, insetos (tripes e mosca-branca), toxidez e deficiência de nutrientes (como zinco) (LOZANO et al., 1983). Assim, a utilização de testes diagnósticos evita erros associados à diagnose feita apenas pelos sintomas na planta e também permite indexar matrizes, promovendo a obtenção de mudas livres de vírus. De acordo com Gallo e Crocomo (1995), a identificação correta dos vírus é importante para o estabelecimento de estratégias que visam o seu controle.

A técnica de transmissão de vírus é de fundamental importância para o estudo de doenças viróticas. A inoculação mecânica é muito utilizada na transmissão experimental em laboratório, visando a obtenção de isolados virais para a manutenção do inoculo, determinação da gama de hospedeiras e estudos de infectividade (WALKEY, 1991).

O teste de diagnóstico utilizando transmissão mecânica em plantas indicadoras pode ser feito com o mínimo de instalações e os sintomas característicos produzidos pelas plantas permitem a detecção e identificação de vírus conhecidos. Embora este teste não proporcione a identificação precisa do vírus, ainda é usado como um ensaio importante no diagnóstico de vírus. Os vírus que não são transmitidos mecanicamente podem ser inoculados sobre plantas indicadoras por enxertia ou utilizando insetos vetores, porém, isto é mais complexo, pois requer contínua manutenção do vetor e do vírus (WALKEY, 1991).

Para evitar erros na detecção de vírus, métodos sorológicos e moleculares vêm sendo utilizados e estes não somente detectam, mas servem para a caracterização dos vírus de planta (LIMA, 2009).

## 6.1. Métodos Sorológicos

A detecção de vírus de plantas por de testes sorológicos são as formas mais usadas na identificação, na quantificação e na caracterização de vírus de plantas, permitindo uma maior sensibilidade na detecção das partículas virais (SHUKLA; WARD; BRUNT, 1994).

O método sorológico mais utilizado na detecção de vírus em material vegetal é o ELISA (*Enzyme-linked immunosorbent assay*), sendo este utilizado pela primeira vez na detecção de vírus de plantas por Clark e Adams em 1977 (LIMA, 2009). A técnica se baseia na reação antígeno-anticorpo associada às propriedades colorimétricas, a qual pode ser detectada em pequenas quantidades. As variações do ELISA diferem na sensibilidade e na capacidade de detectar as partículas virais sorologicamente relacionadas (KOENING; PAUL, 1982).

Este método apresenta como vantagens sua rapidez, pois os resultados são obtidos em um curto período, que variam entre 24 a 48 horas, sua sensibilidade na detecção, além de permitir testar um grande número de amostras de uma só vez (SHUKLA; WARD; BRUNT, 1994). Porém, uma das principais desvantagens é o fato de não existir anticorpos específicos para todos os vírus que infectam plantas (LIMA, 2009).

## 6.2. Métodos Moleculares

O método molecular é baseado na detecção de ácido nucléico, sendo a reação em cadeia da PCR a mais utilizada. Este método é relativamente simples e muito sensível para detecção de vírus, no qual um número ilimitado de cópias de fragmentos selecionados de DNA pode ser gerado em um curto período de tempo (FERREIRA, GRATTAPAGLIA, 1998).

A reação é baseada na amplificação enzimática de sequências específicas de DNA (via PCR) ou RNA (via *reverse transcription*-PCR (RT-PCR)) envolvendo passos que se repetem ciclicamente. A detecção por PCR é muito útil para vírus que são difíceis de purificar e estão presentes em quantidades mínimas na hospedeira (FERREIRA, GRATTAPAGLIA, 1998).

O sucesso na detecção de vírus em amostras via PCR depende da eficiência do processo empregado e da qualidade da extração dos ácidos nucléicos a partir do material vegetal. A sensibilidade da detecção pode ser reduzida por inibidores que podem estar

presentes no extrato dos ácidos nucléicos. Devido a sua alta sensibilidade, a transcrição reversa acoplada à PCR (RT-PCR) é o método molecular mais utilizado na detecção de vírus de plantas (LOPEZ et al., 2003).

### 6.2.1. Detecção molecular do BSV

As ferramentas de indexação do BSV comumente utilizadas incluem inspeção visual dos sintomas que são altamente esporádicos e podem ser confundidos com os do (CMV), a microscopia eletrônica de imunoabsorção (*Immuno-Sorbent Electron Microscopy* – ISEM) que é trabalhosa, complexa e requer equipamentos caros, e o teste sorológico ELISA, que eventualmente pode se mostrar insensível, devido a heterogeneidade sorológica entre os isolados do BSV (LOCKHART; OLSZEWSKI, 1993). A detecção por meio da PCR é limitada pela integração de sequências virais no genoma do hospedeiro, que faz com que a técnica dê falsos positivos na detecção de BSV. Com isso, torna-se necessário o desenvolvimento de métodos de detecção mais precisos para o correto diagnóstico do BSV (WAMBULWA et al., 2012).

Uma tentativa de contornar o desafio colocado pelas sequências integradas, a detecção de BSV episomal por PCR pode ser precedida por uma etapa de imunocaptura para evitar a amplificação dessas sequências (WAMBULWA et al., 2012).

A técnica de imunocaptura-PCR (IC-PCR) é de 10 a 100 vezes mais sensível que o ELISA, apresenta alta especificidade, pois combina a eficiência dos anticorpos que capturam o vírus específico com a amplificação posterior por PCR com *primers* para o vírus. Os vírus capturados pelo anticorpo por meio das proteínas capsidiais liberam os ácidos nucléicos por ação de calor, sendo posteriormente amplificados pela PCR, empregando-se *primers* específicos (MIYAI, 2006).

No entanto, este método tem sérias limitações como a incapacidade do antissoro em capturar todos os isolados do BSV, devido a heterogeneidade antigênica entre os isolados, o uso de diversos conjuntos de *primers* que são incapazes de detectar a diversidade de sequência de BSV e a presença de contaminantes, ácido nucléicos restantes nos microtubos, resultando em falsos positivos (JAMES et al., 2011).

Para contornar essas limitações, vem sendo utilizada a técnica de amplificação por círculo-rolante (RCA), que, ao contrário da técnica de PCR, amplifica especificamente o genoma episomal circular de BSV e não sequências integradas. Este teste de diagnóstico

permite a detecção específica não apenas do genoma circular do *Badnavirus*, mas também a distinção entre o DNA integrado no genoma da bananeira da forma episomal do vírus (JAMES et al., 2011).

A primeira aplicação da técnica RCA utilizando a DNA polimerase phi29 em genoma viral ocorreu em 2004, sendo demonstrado que o genoma do vírus do papiloma, composto de DNA de fita dupla circular, pôde ser eficientemente amplificado a partir de amostras de tecido infectado utilizando esta técnica. Ao mesmo tempo, Inoue-Nagata et al. (2004) também utilizaram este método para a clonagem de um segmento de DNA de fita simples circular do genoma.

O princípio geral da técnica de amplificação por círculo-rolante (RCA) é mostrado esquematicamente na Figura 6. Após o anelamento *primer* específico na molécula molde da fita simples, a polimerase incorpora os nucleótidos no sentido 5'– 3' na direção complementar à cadeia molde. No caso de uma molécula molde linear, a síntese é completada no final do molde (Figura 6a). Para uma molécula molde circular, a polimerase atinge o local de ligação do iniciador deslocando novamente a nova fita sintetizada e continua com a síntese do DNA em vários ciclos (Figura 6b). Por este mecanismo, uma molécula de DNA extensa, que consiste em cópias repetidas da sequência molde é produzida com uma amplificação mais eficiente de uma sequência circular alvo em comparação com um modelo linear (JOHNE et al., 2009).

Outro método utilizado é o da amplificação com múltiplos *primers* com sequências aleatórias que se ligam a vários locais da molécula molde, produzindo uma amplificação altamente eficiente. Várias técnicas para amplificação do genoma (linear) completo de organismos superiores foram desenvolvidas utilizando este princípio. Para moléculas molde circular, a amplificação com múltiplos *primers* ainda é mais eficiente devido ao fato mencionado acima (Figura 6c) (JOHNE et al., 2009).



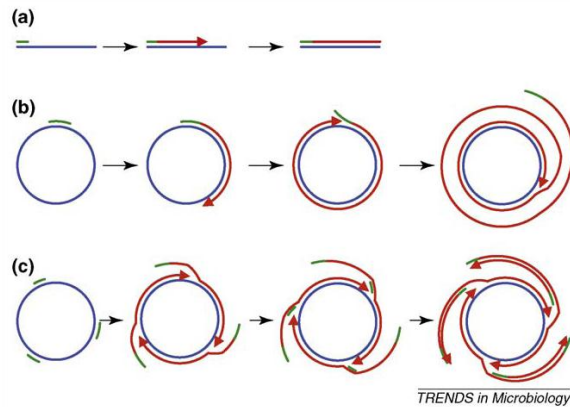


Figura 6. Princípio da amplificação por círculo-rolante. As linhas azuis indicam a seqüência de DNA alvo, as linhas verdes representam os *primers* e as linhas vermelhas representam o novo DNA sintetizado pela polimerase. As pontas de seta indicam a extremidades 3' de polimerização das fitas de DNA. (a) modelo linear e *primer* único. Após a ligação do *primer*, a polimerase sintetiza uma fita complementar. (b) modelo circular e com um único *primer*. A polimerase sintetiza uma fita complementar iniciando pelo *primer*. Depois do ciclo completo, o *primer* e a fita sintetizada são deslocados e a síntese de DNA continua em ciclos adicionais. (c) modelo circular e múltiplos *primers* aleatórios. A síntese é iniciada com os múltiplos *primers* ligados a um molde. A síntese de DNA com o deslocamento da fita é realizada como em (b). No entanto, *primers* ainda presentes são utilizados como pontos de iniciação para a síntese de DNA adicionais, conforme Johne et al.,(2009).

A aplicação da técnica RCA para a detecção de vírus que infectam plantas havia sido empregada até então para os vírus de genomas de DNA de fita simples, como os das famílias *Geminiviridae* e *Nanoviridae*. Porém, James et al. (2011) utilizaram a técnica de RCA para a detecção de isolados de BSV infectando bananeira e diferenciaram entre seqüências genômicas virais episomais e integradas, além da detecção, com este mesmo método, de outros pararetrovirus dentro da família *Caulimoviridae*, como o *Cauliflower mosaic virus* (CaMV).

A amplificação por RCA, utilizando DNA polimerase do bacteriófago *Phi29*, é um protocolo de seqüência independente que tem sido utilizado para a amplificação e caracterização de moléculas de DNA circular, incluindo plasmídeos e vários grupos de vírus de DNA que infectam os seres humanos, animais e plantas (JAMES et al., 2011).

## 7. REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, A. M. R.; LIMA, J. A. A. Técnicas sorológicas aplicadas à fitovirologia. In: ALMEIDA, A. M. R.; LIMA, J. A. A. (Eds.) **Princípios e técnicas de diagnose aplicadas em Fitovirologia**. Fortaleza: SBF, 2001. p. 33-62.
- ALVES, E. J. **A cultura da banana: aspectos técnicos, sócio-econômicos e agro-industriais**. 2. ed. Brasília: EMBRAPA-SPI/Cruz das Almas, 1999. 585 p.
- ALVES, E. J.; LIMA, M. B.; SANTOS-SEREJO, J. A.; TRINDADE, A. V. Propagação. In: TRINDADE, A. V, et al. **O cultivo da bananeira**. 21. Cruz das Almas: EMBRAPA-Mandioca e Fruticultura, 2004. p. 59-86.
- ARANDA, M. A; FRAILE A.; GARCÍA-ARENAL, F. Genetic Variability and Evolution of the Satellite RNA of *Cucumber Mosaic Virus* during Natural Epidemics. **Journal of Virology**, v. 67, p. 5896-5901, 1993.
- BANERJEE, N.; DE LANGHE, E. A tissue culture technique for rapid clonal propagation and storage under minimal growth conditions of *Musa* (banana and plantain). **Plant Cell Reports**, v. 4, n. 6, p. 351-354, 1985.
- BELALCAZAR CARVAJAL, S. L. **El cultivo del plátano en el tropico**. Montpellier: INIBAP/ICA, 1991 (Manual de assistência técnica, n. 50).
- BERG, L. A.; BUSTAMANTE, M. Heat treatment and meristem culture for the production of virus-free bananas. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 64, n. 3, p. 320-322, 1974.
- BORGES, A. L.; OLIVEIRA, A. M. G.; RITZINGER, C. H. S. P.; ALMEIDA, C. O. de; COELHO, E. F.; SANTOS-SEREJO, J. A.; SOUZA, L. S.; LIMA, M. B; FANCELLI, M.; FOLEGATTI, M. I. S.; FILHO, P. E. M.; SILVA, S.; MEDINA, V. M.; CORDEIRO, Z. J. M. **A cultura da banana/ EMBRAPA-Mandioca e Fruticultura Tropical**, 3. ed. Brasília, DF: EMBRAPA-Informação Tecnológica, 2006 (Coleção Plantar, n. 56).
- BORGES, A. L.; SOUZA, L. da S. (Ed.) **O cultivo da bananeira**. Cruz das Almas: EMBRAPA-Mandioca e Fruticultura, 2004. 279 p.
- BRIOSO, P. S. T. *Badnavirus* e seu controle. In: 45º Congresso Brasileiro de Fitopatologia, 2012, Manaus. **Anais... Tropical Plant Pathology**, 37 (Suplemento), Manaus: Sociedade Brasileira de Fitopatologia, 2012.
- 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**, Jaboticabal, v. 26, n. 2, p. 257-259, 2000.
- BUJARSKI, J.; FIGLEROWICZ, M.; GALLITELLI, D.; ROOSSINCK, M. J.; SCOTT, S. W. Family Bromoviridae. In: KING, A. M. Q.; ADAMS, M. J.; CARSTENS, E. B.;

LEFKOWITZ, E. J. (eds) **Virus Taxonomy: Ninth report of the international committee on the taxonomy of viruses**. Elsevier Academic Press, San Diego, p. 965–976, 2012.

CASTRO, P. R. C.; KLUGE, R. A.; SESTARI, I. **Manual de Fisiologia Vegetal: fisiologia dos cultivos**. Piracicaba, 2008. 864 p.

CARVALHO, A. C. P. P.; RODRIGUES, A. A. J.; SANTOS, E. O. **Produção de Mudanças Micropropagadas de Bananeira**. Fortaleza: EMBRAPA-Agroindústria Tropical, 2012. 14 p. (Circular Técnica, n. 37).

CORDEIRO, Z. J. M.; MATOS, A. P.; MEISSNER FILHO, P. E. Doenças e métodos de controle. In: BORGES, A. L.; SOUZA, L. S. (Ed.) **O cultivo da bananeira**. Cruz das Almas: EMBRAPA-Mandioca e Fruticultura, 2004. p.146-182.

CORDEIRO, Z. J. M.; MESQUITA, A. L. M. Manejo integrado das pragas, doenças e plantas daninhas. In: CORDEIRO, Z. J. M. (Org.). **Banana: Fitossanidade**. Cruz das Almas: EMBRAPA-Mandioca e Fruticultura. – Brasília: EMBRAPA-Comunicação para Transferência de Tecnologia, v.1, p. 15-20, 2000.

COX, E. A.; STOTZKY, G.; GOOS, R. D. *In vitro* culture of *Musa balbisiana* Cola embryos. **Nature**, London, v. 185, p. 403-404, 1960.

DAHAL, G.; HUGHES, J.; GAUHL, F.; PASBERG-GAUHL, C.; NOKOE, K. S. Symptomatology and development of banana streak, a disease caused by *Banana streak Badnavirus*, under natural conditions in Ibadan, Nigeria. In: I International Conference on Banana and Plantain for Africa, 2000, África. **ISHS Acta Horticulturae 540**, África, 2000. p. 361-375.

DANIELS, J.; CAMPBELL, R. N. Characterization of *Cucumber mosaic virus* isolates from California. **Plant Disease**, v. 76, p. 1245-1250, dez. 1992.

DANTAS, J. L. L.; SOARES FILHO, W. S. Classificação botânica, origem e evolução. In: CORDEIRO, J. M. (Org.). **Banana produção: aspectos técnicos**. Brasília: EMBRAPA-Comunicação para Transferência de Tecnologia, 2000. 143 p.

DOOLITTLE, S. P. A new infectious mosaic disease of cucumber. **Phytopathology**, v. 6, p. 145–147, 1916.

EIRAS, M.; BOARI, A. J.; COLARICCIO, A.; CHAVES, A. L. R.; BRIONES, M. R. S.; FIGUEIRA, A. R.; HARAKAVA, R. Characterization of isolates of the *Cucumovirus Cucumber mosaic virus* present in Brazil. **Journal of Plant Pathology**, Itália, v. 86, n. 1, p. 61-69, 2004.

EIRAS, M.; COLARICCIO, A.; CHAVES, A. L. R. Isolado do vírus do mosaico do pepino obtido de bananeira no Estado de São Paulo pertence ao subgrupo Ia. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 26, n. 1, p. 53-59, mar. 2001.

FANCELLI, M.; MESQUITA, A. L. M. Pragas. In: CORDEIRO, Z. J. M. (Org.). **Banana: Fitossanidade**. Cruz das Almas: EMBRAPA-Mandioca e Fruticultura. – Brasília: EMBRAPA-Comunicação para Transferência de Tecnologia, v. 1, p. 21-35, 2000.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3. ed., Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 1998. 220p.

FIGUEIREDO, D. V.; BRIOSO, P. S. T. Multiplex PCR for detection of *Banana streak virus* and *Cucumber mosaic virus* from micropropagated banana. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 33, n. 3, p. 229-232, jul/set. 2007.

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

FOLEGATTI, M. I. S.; MATSSURA, F. C. A. U. Capítulo XIII-Processamento. In: BORGES, A. L.; SOUZA, L. da S. (Ed.) **O cultivo da bananeira**. Cruz das Almas: EMBRAPA-Mandioca e Fruticultura, 2004. p. 232-244.

FRISON, E. A.; SHARROCK, S. L. *Banana streak virus*: a unique virus-Musa interaction? In: Workshop of the promusa virology working group, 1998, Montpellier, France **Proceedings...**, 1998. 71 p.

GALLO, L. A.; CROCOMO, O. J. A cultura de tecidos em fitopatologia. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. (Eds.). **Manual de Fitopatologia: Princípios e Conceitos**. 3. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995. v. 1, p. 495-505.

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

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

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, fev. 2005.

GEERING, A. D. W.; HULL, R. Family *Caulimoviridae*. In: KING, A. M. Q.; ADAMS, M. J.; CARSTENS, E. B.; LEFKOWITZ, E. J. (Eds.) **Virus taxonomy: Ninth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses**. Academic Press, Boston, MA. P. 429-443, 2012.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Eds.). **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas**. Brasília, DF: EMBRAPA, CNPH, 1998. v. 1, p. 183-260.

GUIMARÃES, N. C. C.; TORGA, P. P.; RESENDE, E. C.; JÚNIOR, A. C.; PAIVA, E.; PAIVA, L. V. Identificação de variantes somaclonais em bananeiras 'Prata anã', utilizando técnicas moleculares e citogenéticas. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 33, n. 2, p. 448-454, mar/abr., 2009.

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

HARPER, G.; HULL, R.; LOCKHART, B.; OLSZEWSKI, N. Viral sequences integrated into plant genomes. **Annual Review of Phytopathology**, v. 40, p. 119-136, set. 2002.

IBGE-Instituto Brasileiro de Geografia E Estatística. Produção vegetal e área colhida dos estabelecimentos agropecuários por tipo de produção vegetal – série histórica. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br/>>. Acesso em: 3 de set. 2012.

ICTV - INTERNACIONAL COMITEE ON TAXONOMY OF VIRUSES. **Virology Division**. Disponível em: [www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp?version=20011](http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp?version=20011). Acesso em: 5 out. 2012.

INOUE-NAGATA, A. K.; ALBUQUERQUE, L. C.; ROCHA, W. B.; NAGATA, T. A simple method for cloning the complete begomovirus genome using the bacteriophage phi29 DNA polymerase. **Journal of Virological Methods**, Amsterdam, v. 116, p. 209-211, 2004.

JAMES, A. P.; GEIJSKES, R. J.; DALE, J. L.; HARDING, R. M. Development of a novel rolling-circle amplification technique to detect *Banana streak virus* that also discriminates between integrated and episomal virus sequences. **Plant Disease**, v. 95, p. 57-62, dez. 2011.

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

JONES, D. R.; LOCKHART, B. E. L. **Banana streak disease**. Montpellier: INIBAP, 1993. 1 p.

KAPER, J. M.; WATERWORTH, H. E. *Cucumber mosaic virus* associated RNA 5: causal agent for tomato necrosis. **Science**, v. 196, n. 4288, p. 429-431, abr. 1977.

KOENIG, R.; PAUL, H. L. Variants of ELISA in plant virus diagnosis. **Journal of Virological Methods**, v. 5, n. 2, p. 113-125, out. 1982.

LIMA, M. F. **Deteção e Controle de Vírus em Videira**. Petrolina: EMBRAPA-Semiárido, 2009 (Circular Técnica, n. 90).

LOCKHART. B. E. L.; OLSZEWSKI, N. E. Serological and Genomic Heterogeneity of *Banana streak badnavirus*: implications for Virus Detection in Musa Germplasm. In: GANRY, J. (Ed.). **Breeding Banana and Plantain for Resistance to Diseases and Pests**, CIRAD, Montpellier, France 1993, p. 105-130.

LOPEZ, M. M.; BERTOLINI, E.; OLMOS, A.; CARUSO, P.; GORRIS, M. T.; LLOP, P.; PENYALVER, R.; CAMBRA, C. Innovative tools for detection of plant pathogenic viruses and bacteria. **International Microbiology**, v. 6, n. 4 p. 233-343, dez. 2003.

LOZANO, J. C.; BELLOTTI, A.; REYS, J. A.; HOWELER, R.; LEIHNER, D.; DOLL, J. **Problemas no cultivo da mandioca**. Brasília: EMBRATER, 208 p., 1983.

MACIEL-ZAMBOLIM, E.; ASSIS, M. I. T.; ZAMBOLIM, L.; VENTURA, J. A.; CARVALHO, M. G. Infecção natural de bananeira cultivar Prata (AAB) pelo vírus do mosaico do pepino no estado de Minas Gerais. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 19, n. 3, p. 483-484, 1994.

MA, S. S.; SHII, C. R. In vitro formation of adventitious buds in banana shoot apex following decapitation. **Journal of Chinese Society for Horticultural Science**, v. 18, p. 135-142, 1972.

MEISSNER FILHO, P.; BRIOSO, P. S. T. Doenças causadas por vírus. In: CORDEIRO, Z. J. M. (Org.). **Banana: Fitossanidade**. Cruz das Almas: EMBRAPA-Mandioca e Fruticultura. – Brasília, DF: EMBRAPA-Comunicação para Transferência de Tecnologia, v. 1, p. 78-82, 2000.

MENDONÇA, V.; GONTIJO, T. C. A.; ABREU, N. A. A.; DANTAS, D. J.; MARTINS, P. C. C. Propagação da Bananeira e Cuidados na Instalação do Pomar. **Revista Científica Eletrônica de Agronomia**, 3. ed. jun. 2003.

MIYAI, T. **Deteção de Odontoglossum ringspot virus em orquídeas por Imunocaptura-RT-PCR com anticorpos policlonais produzidos contra proteína capsidial recombinante**. 2006. 63 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Instituto de Pesquisas Tecnológicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

MOREIRA, R. S. **Banana: teoria e prática de cultivo**. Fundação Cargill. Campinas, 335 p. 1987.

MOREIRA, R. S.; CORDEIRO, Z. J. M. A história da banana no Brasil. In: XVII Reunião Internacional da Associação para a Cooperação nas Pesquisas sobre Banana no Caribe e na América Tropical 17., 2006, Santa Catarina. **Anais...** Joinville, 2006. p. 48-82.

OLIVEIRA, H. S. **Comportamento de cultivares de bananeira (*Musa spp.*) resistentes a doenças no processo de micropropagação**. 2010. 79 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal Rural da Amazônia, Belém, 2010.

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

RODRIGUES, P. H. V.; TULMANN NETO, A.; CASSIERI NETO, P.; MENDES, B. M. J. Influência do número de subcultivos na ocorrência de variação somaclonal em mudas de bananeira cv. Nanicão, no Vale do Ribeira - SP. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 20, n. 1, p. 74-79, 1998.

ROOSSINCK, M. J. Evolutionary history of *Cucumber mosaic virus* deduced by phylogenetic analysis. **Journal of Virology**, v. 76, n. 7, p. 3382-3387, abr. 2002.

SALERNO, A. R.; ZAFFARI, G. R. Micropropagação da bananeira (*Musa sp.* Grupo AAA, subgrupo Cavendish): efeito do espaçamento e empilhamento de recipientes em sala de crescimento. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 21, n. 2, p. 204-207, 1999.

SANTOS, C. C. C.; RODRIGUES, P. H. V. Variação somaclonal em mudas micropropagadas de bananeira, cultivar *Pacovan*, **Bragantia**, Campinas, v. 63, p. 201-205, 2004.

SANTOS-SEREJO, J. A.; SOUZA, A. S.; MORAIS, L. S.; SOARES, T. L.; SOUZA, F. V. D.; KOBAYASHI, A. K.; FERREIRA, C. F.; SILVA, S. O. Biotecnologia: algo mais que plantas transgênicas. In: XVII Reunião Internacional da Associação para a Cooperação nas Pesquisas sobre Banana no Caribe e na América Tropical 17., 2006, Santa Catarina. **Anais...** Joinville, 2006. p. 10-23.

SEAB-Secretaria de Agricultura e do Abastecimento; DERAL-Departamento de Economia Rural. **Evolução da área colhida, produção, rendimento, participação e colocação Paraná/Brasil.** Disponível em: <<http://www.seab.pr.gov.br/>>. Acesso em: 20 nov. 2012.

SHUKLA, D. D.; WARD, C. W.; BRUNT, A. A. The Potyviridae. **Centre for Agriculture and Biosciences International.** Cambridge. Cambridge University Press. 1994.

SILBERSCHMIDT, K.; NÓBREGA, N. R. Sobre uma doença de vírus da bananeira. **O Biológico**, São Paulo, v.7, n. 2, p. 216-219, 1941.

SILVA NETO, S. P.; SILVA, M. S. **Cultura de tecidos no controle de viroses no Brasil.** 1. ed. Planaltina, DF: EMBRAPA-Cerrados, 2009. (Documento 274), 29 p.

SILVA, J. T. A.; BORGES, A. L.; MALBURG, J. L. Solos, adubação e nutrição da bananeira. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 20, n. 196, p. 21-36, 1999.

SILVEIRA, D. G.; SOARES, T. M.; MEISSNER FILHO, P. E.; LIMA NETO, F. P.; CALDAS, R. C. Efeitos do *Banana streak virus* sobre o desenvolvimento de cultivares de bananeira. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 33, n. 2, p.190-191, 2007.

SINGH, Z.; JONES, R. A. C.; JONES, M. G. K. Identification of *Cucumber mosaic virus* subgrup I isolates from banana plants affected by infectious chlorosis disease using RT-PCR. **Plant Disease**, v. 79, n.7, p. 713-716, jul. 1995.

SOTO BALLESTERO, M. **Bananos: cultivo y comercialización.** 2. ed., San José, Costa Rica: Litografia E Imprenta Lil, 1992. 674 p.

SOUZA, A. S.; CORDEIRO, Z. J. M.; TRINDADE, A. V. Produção de mudas. In: CORDEIRO, J. M. (Org.) **Banana produção: aspectos técnicos.** Brasília, DF: EMBRAPA-Comunicação para Transferência de Tecnologia, 2000. p. 39-46.

STAGINNUS, C. H.; RICHERT-PÖGGELER, K. R. Endogenous pararetroviruses: two-faced travelers in the plant genome. **Trends in Plant Science**, v. 11, n. 10, p. 485-491, set. 2006.

WALKEY, D. G. A. **Applied Plant Virology.** London: Chapman & Hall, 1991. 338 p.

WAMBULWA, M. C.; WACHIRA, F. N.; KARANJA, L. S.; MUTURI, S. M. 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**, v.3, p. 1581-1587, 2012.

WYLIE, S.; WILSON, C. R.; JONES, R. A. C.; JONES, M. G. K. A polymerase chain reaction assay for *Cucumber mosaic virus* in lupin seeds. **Australian Journal of Agriculture Research**, v. 44, n. 1, p. 41-51, 1993.

ZITTER, T. A.; MURPHY, J. F. *Cucumber mosaic*. **The Plant Health Instructor**. 2009. Disponível em: F:\Cucumber mosaic virus murph e zitter.htm. Acesso em: novembro de 2012.

ZONETTI, P. C.; SANTOS, P. C.; BOLIANI, A. C.; SCARPARE FILHO, F. A.; FIGUEIRA, A. V.; SOUZA, S. A. C. D.; TULMANN NETO, A. Avaliação de variante somaclonal de porte baixo de bananeira 'Nanicão Jangada' (*Musa* spp.) em duas densidades. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 25, n. 3, p. 471-474, 2003.



## CAPÍTULO 2

Micropropagação *in vitro* de genótipos de bananeira e indexação para o  
*Cucumber mosaic virus* e *Banana streak virus*

Micropropagação *in vitro* de genótipos de bananeira e indexação para o  
*Cucumber mosaic virus* e *Banana streak virus*

**RESUMO**

Este trabalho teve como objetivo padronizar um protocolo para a micropropagação *in vitro* de variedades de bananeira do grupo Cavendish, cultivadas no Paraná, e indexar as mudas produzidas para o *Cucumber mosaic virus* (CMV) e para o *Banana streak virus* (BSV) através do teste sorológico DAS-ELISA. A micropropagação *in vitro* de bananeiras do grupo Cavendish resultou na produção de 3.653 plantas a partir de 151 gemas, sendo que a maior produção foi obtida com os rizomas originários de perfilhos medindo de 20 a 60 cm, com média de 42 plantas por gema. De um total de 57 plantas testadas por DAS-ELISA, 25 se apresentaram infectadas com o BSV, 4 com o CMV e 28 estavam sadias, representando 49% do total de plantas. Também foram testadas 4 plantas da variedade Maçã, obtidas por micropropagação e adquiridas de uma empresa comercial, sendo que, neste caso, o CMV e o BSV foram detectados em infecção mista em todas as plantas, evidenciando, assim, a importância da indexação viral para a garantia da qualidade fitossanitária dos bananais.

**Palavras-chave:** DAS-ELISA. *Cucumovirus*. *Badnavirus*. Micropropagação.

*In vitro* micropropagation of banana genotypes and indexing for *Cucumber mosaic virus* and *Banana streak virus*

**ABSTRACT**

The objective of this study was to standardize a protocol for *in vitro* micropropagation of banana varieties of Cavendish group, grown in Paraná, and to index produced seedlings for *Cucumber mosaic virus* (CMV) and *Banana streak virus* (BSV) by serological DAS-ELISA tests. The *in vitro* micropropagation of banana Cavendish group resulted in the production of 3653 plants from 151 gems. The highest production was obtained with rhizomes originated from tillers measuring 20-60 cm, with a mean of 42 plants per gem. Of a total of 57 plants tested by DAS-ELISA, 25 were infected with BSV, 4 with CMV, and 28 were healthy, representing 49% of the total. Also 4 plants of Maçã variety, obtained by micropropagation, and acquired from a commercial company, were tested, and CMV and BSV were detected in mixed infections in all plants, emphasizing the importance of viral indexing for ensuring the quality of banana plantation areas.

**Key words:** DAS-ELISA. *Cucumovirus*. *Badnavirus*. Micropropagation.

## 1. INTRODUÇÃO

Os baixos índices de produtividade e a má qualidade dos frutos de banana tem se tornado um dos principais obstáculos para a expansão da cultura da bananeira e estes problemas levam à falta de mudas tanto em quantidade como em qualidade. A qualidade da muda é um fator muito importante, pois está relacionada à precocidade de produção, uniformidade do material, vigor, sanidade das plantas, custos de produção e produtividade (COUCEIRO et al., 2001).

No Brasil, existe uma falta de mudas de bananeiras produzidas com tecnologia, que garanta a sua qualidade genética, sem variações somaclonais e fitossanitárias assegurando, assim, o fortalecimento econômico de exploração e atendendo às exigências do mercado consumidor. Isso acaba desestimulando a produção de mudas e inviabilizando iniciativas de implantação de viveiros comerciais (CHAVES et al., 2000).

A grande maioria dos produtores brasileiros de banana ainda utilizam mudas provenientes de bananais já existentes por meio do sistema de propagação convencional, que, além de ser lento para a obtenção de mudas, também possibilita a disseminação de doenças como o Mal-do-Panamá (*Fusarium oxysporium* f. sp. *cubense*), Moko (*Haustonia solanacearum*), Sigatoka-negra (*Mycosphaerella fijiensis* var. *difformis*), nematoses, broca-do-rizoma (*Cosmopolites sordidus*) e viroses como a do mosaico infeccioso da bananeira e a doença da folha estriada de bananeira que são, atualmente, um dos fatores limitantes à expansão da cultura no Brasil (PEREIRA et al., 2005).

Os vírus associados às doenças da bananeira podem ser transmitidos por insetos vetores e por meio da propagação vegetativa, o que pode ocasionar uma ameaça à produção, tanto nas áreas onde os vírus são endêmicos, quanto naquelas livres de vírus, mas que recebem novas mudas. Até o momento, o vírus do mosaico do pepino (*Cucumber mosaic virus*, CMV), gênero *Cucumovirus*, e o vírus das estrias da bananeira (*Banana streak virus*, BSV), gênero *Badnavirus*, foram registrados em bananeiras cultivadas no Brasil (MEISSNER; BRIOSO, 2000). Segundo Brioso et al., (2000) as bananeiras podem ser infectadas por mais de um vírus ao mesmo tempo e os estudos demonstraram que bananeiras infectadas com o BSV apresentam sintomas que podem ser muitas vezes confundidos com aqueles causados pelo CMV, sendo, deste modo, indistinguíveis os sintomas causados pela dupla infecção promovida por estes vírus.

Devido a estes problemas fitossanitários, o sucesso do empreendimento depende principalmente da qualidade das mudas que serão utilizadas, pois irão influenciar de forma direta no desenvolvimento e produção do bananal (CORDEIRO; MESQUITA, 2000). Assim, para a implantação de um pomar, de qualquer espécie vegetal, as mudas constituem um dos itens mais importantes.

Segundo Salerno e Zaffari (1999), a produção de mudas de bananeira por meio da micropropagação vegetativa tem apresentado amplo desenvolvimento nos últimos anos em diversos países. No Brasil, a demanda por mudas de bananeira de qualidade tem aumentado, tanto para a renovação dos bananais de regiões produtoras como também em áreas novas e, com isso, houve a expansão dos laboratórios de micropropagação no país.

As plantas de bananeira micropropagadas crescem mais rapidamente nos primeiros estádios de desenvolvimento, em comparação com as mudas convencionais, apresentam maior precocidade, florescendo até quatro meses antes que as plantas convencionais e proporcionam colheitas superiores (ÁLVARES; CALDAS, 2002). Além da obtenção de mudas livres de doenças e pragas, as mudas micropropagadas são produzidas rapidamente, em espaço físico reduzido, são fáceis de serem transportadas, proporcionam uniformidade nos tratamentos culturais e na colheita no primeiro ciclo da cultura e são mais produtivas no primeiro ciclo em comparação com as convencionais (PEREIRA et al., 2005).

Este trabalho teve como objetivo padronizar um método de multiplicação *in vitro*, visando a produção de mudas de bananeiras das variedades Jangada, Grande Naine, IAC 2001 e Nanicão Comum, e após, realizar a indexação viral para o *Cucumber mosaic virus* e o *Banana streak vírus* através do método sorológico DAS-ELISA.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

Os trabalhos foram conduzidos no Laboratório de Biotecnologia Vegetal do Departamento de Agronomia da Universidade Estadual de Maringá e em casa de vegetação.

Primeiramente, foi padronizada a metodologia de micropropagação *in vitro* das mudas de bananeiras a partir do protocolo proposto Zaffari et al. (1994), desenvolvido para variedades de bananeiras comercializadas no estado de Santa Catarina.

Foram utilizados perfilhos, provenientes de brotações laterais de plantas adultas, aparentando livre de vírus, coletados aleatoriamente em diferentes estágios de desenvolvimento, sem padronização de tamanho, conforme fornecidos por produtores de banana dos municípios de Rio Bom e Novo Itacolomi no Norte do Paraná. Foram utilizados perfilhos das variedades de bananeira, Jangada, Grande Naine, IAC 2001 e Nanicão Comum, pertencentes ao subgrupo Cavendish (AAA) do tipo Nanicão (Tabela 1).

Tabela 1. Rizomas de diferentes variedades de bananeiras utilizados na padronização da metodologia de micropropagação *in vitro*.

Variedades de bananeiras	Número de rizomas
'Grande Naine'	14
'Nanicão Comum'	6
'Jangada'	58
'IAC 2001'	6
Total	84

Posteriormente, foram realizadas coletas de perfilhos em uma área de produção comercial de banana do município de Andirá-PR. Os perfilhos coletados foram agrupados conforme a altura em centímetros (Tabela 2), medidos a partir da extremidade da folha “vela” até a sua base, e o diâmetro, medido na região correspondente a 2/3 da altura, a partir da base (Figura 1). Esses perfilhos foram utilizados na micropropagação *in vitro* com o objetivo de avaliar a possível influência desses parâmetros no rendimento final do total de mudas provenientes de cada gema.

Tabela 2. Classificação de acordo com o tamanho e diâmetro dos perfilhos de bananeiras da variedade Jangada, provenientes de Andirá-PR, utilizados na micropropagação *in vitro*.

Grupos	N° de rizomas	Tamanho (cm)	Diâmetro (cm)
Grupo 1	39	20 a 39	9 a 22
Grupo 2	35	40 a 49	14 a 20
Grupo 3	21	50 a 59	16 a 23
Grupo 4	18	≥ 60	16 a 20

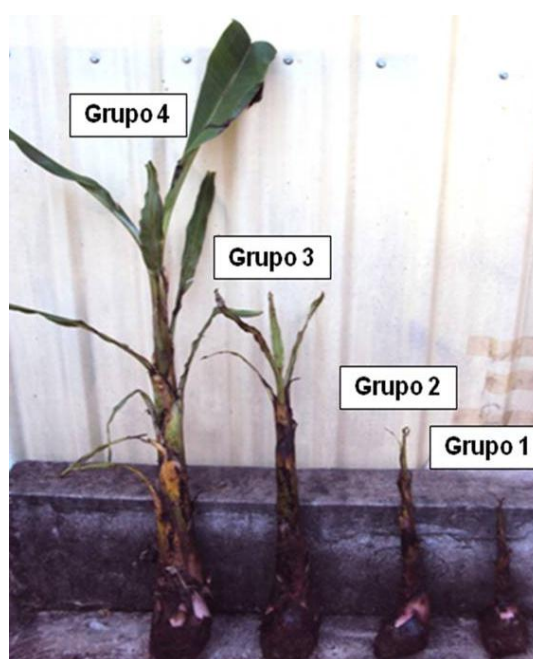


Figura 1. Classificação dos perfilhos de bananeiras utilizados como fonte de rizomas, da variedade Jangada, provenientes de uma área de produção comercial do município de Andirá-PR, agrupados de acordo com o seu tamanho e diâmetro.

De um total de 67 gemas apicais, viáveis, utilizadas no experimento, 10 gemas de cada grupo foram separadas e o rendimento de mudas obtidas em cada grupo foram comparados, e analisados por estatística utilizando o software Sisvar (FERREIRA, 2003), sendo as médias comparadas pelo teste de agrupamento Scott-Knott a 5% de significância. As análises foram feitas para os subcultivos 2, 3 e 4, obtidos de cada um dos 4 grupos.

## 2.1. Multiplicação *in vitro* de genótipos de bananeiras

Após a coleta, foi realizada uma limpeza inicial dos perfilhos utilizando água corrente e, com o auxílio de um facão, foram realizados cortes sucessivos no pseudocaule para redução do rizoma (Figura 2A). Posteriormente, no laboratório, os explantes obtidos sofreram reduções sucessivas até a obtenção, no final, das gemas intactas contidas no seu interior (Figura 2B).

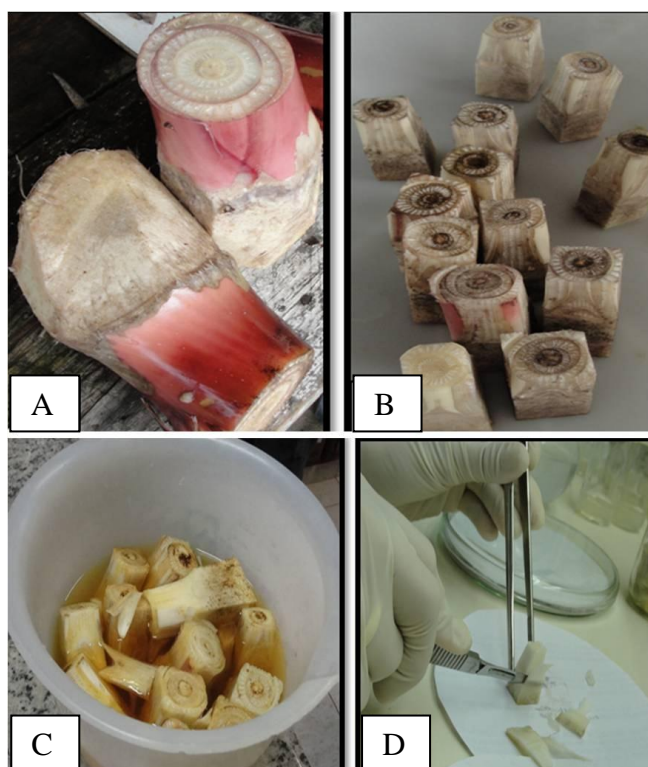


Figura 2. Preparo dos rizomas de bananeiras. A: corte inicial; B: redução do tamanho; C: desinfecção; D: retirada da gema apical.

Após, os rizomas foram desinfetados com solução de hipoclorito de sódio (NaClO) a 2% por 1 hora e transferidos para recipientes contendo água destilada (Figura 2C). Uma nova redução foi realizada em capela de fluxo laminar (Figura 2D) e, em seguida, uma desinfecção com álcool 70% por 5 min, hipoclorito de sódio a 1% por 30 min, e três lavagens com água destilada estéril foram realizadas.

A partir dos rizomas, foram isoladas as gemas apicais e estas inoculadas em meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) designado como meio inicial ou de estabelecimento



(Figura 3A). Este meio também foi suplementado com  $1 \text{ mg.L}^{-1}$  de ANA (Ácido 1-Naftaleno Acético;  $\text{C}_{12}\text{H}_{10}\text{O}_2$ ),  $1 \text{ mg.L}^{-1}$  de BAP (6-Benzilaminopurina;  $\text{C}_{12}\text{H}_{11}\text{N}_5$ ), 30 g de sacarose ( $\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$ ), 7 g de ágar e 5 ml de uma solução estoque de vitaminas [ácido nicotínico (0,50 mg), cloridrato de piridoxina (0,50 mg), cloridrato de tiamina (0,10 mg), glicina (2,0 mg) para 1000 mL], com pH ajustado para 5,7. As gemas foram armazenadas em sala de crescimento a  $25^\circ\text{C}$  no escuro por 10 dias, para evitar oxidações, e, após este período foram mantidas em um fotoperíodo de 16 horas de luz e 8 horas de escuro, à temperatura de  $25^\circ\text{C}$  por mais 50 dias. Após os 60 dias de desenvolvimento inicial das gemas, foram contados o número de gemas mortas por oxidação e o número de gemas contaminadas por fungos e/ou bactérias. Em seguida, as gemas foram subdivididas longitudinalmente para a quebra da dominância apical e para estimular brotações, sendo inoculadas em um novo meio de cultura MS denominado como meio de multiplicação e suplementado com a mesma quantidade de sacarose, ágar e vitaminas do meio inicial, porém, utilizando como regulador de crescimento apenas o BAP, na concentração de  $2,5 \text{ mg.L}^{-1}$  (Figura 3B).

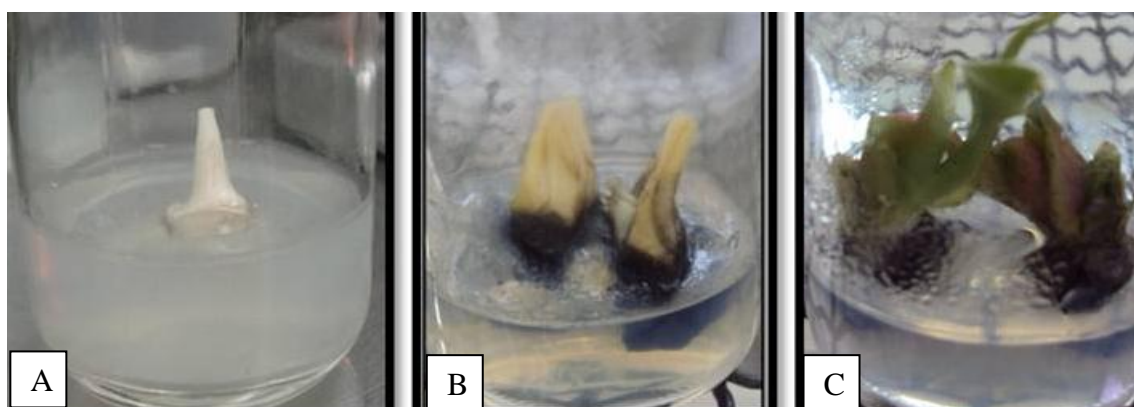


Figura 3. Estabelecimento *in vitro* dos ápices caulinares das bananeiras em diferentes estágios de desenvolvimento. A: gema apical inoculada em meio de cultura MS; B: corte longitudinal da gema; C: brotos iniciais obtidos da gema.

A cada 30 dias, os brotos emitidos das gemas (Figura 3C) foram isolados e reinoculados em um meio de cultura de multiplicação conforme descrito acima. A cada subcultivo, foram eliminados tecidos contendo calos e necrose, e os explantes oxidados e contaminados com fungos e bactérias. No processo de multiplicação dos brotos (Figura 4), foram efetuados de quatro a cinco subcultivos, com duração de cerca de trinta dias cada,

realizando-se o cultivo das gemas laterais provenientes da subdivisão longitudinal dos explantes e/ou, do isolamento das brotações, com o corte das folhas sempre que possível.



Figura 4. Brotações de bananeiras da variedade Jangada, micropropagadas *in vitro*, em meio de cultura MS.

Após atingir o 5º subcultivo, foram realizadas avaliações quanto ao número de plantas produzidas por variedade, a média de plantas por gema apical e a taxa de multiplicação (número de brotos do subcultivo subsequente dividido pelo número de brotos do subcultivo anterior) dos brotos/rizomas nos subcultivos 1 ao 4. Posteriormente, as plantas foram transferidas para um meio de enraizamento (Figura 5A), contendo apenas metade da concentração de sais do meio MS, sem a adição de BAP, porém, com a mesma quantidade de sacarose, ágar e vitaminas do meio inicial. O processo de aclimação ocorreu quando as plantas atingiram a altura do frasco (Figura 5B).

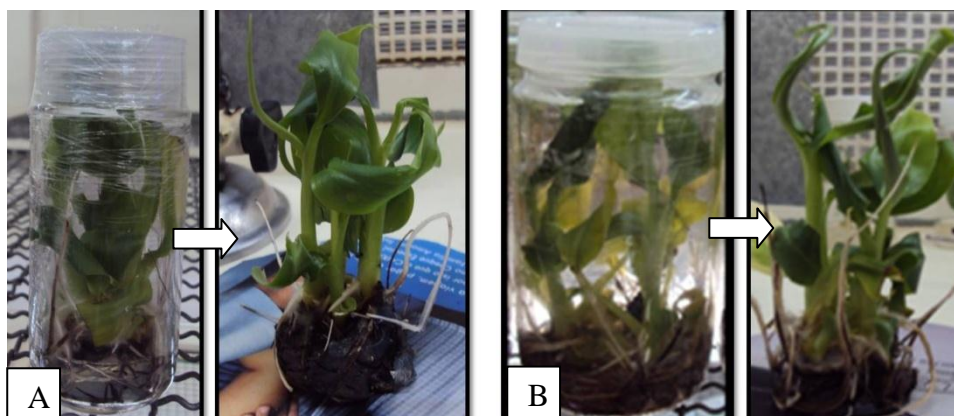


Figura 5. A: Plantas de bananeiras da variedade Jangada atingindo a altura do frasco, prestes a serem transferidas para o meio de enraizamento; B: Plantas apresentando tamanhos ideais para iniciar o processo de aclimação.

A aclimação constou da individualização e limpeza das plantas em água destilada e o subsequente plantio em bandejas plásticas contendo substrato Plantmax<sup>®</sup>, sendo realizadas nos períodos do dia e com temperaturas amenas. Em seguida, as plantas foram mantidas em casa de vegetação, coberta com sombrite, reduzindo-se a radiação plena em 70% e 50% por período em torno de 2 meses (Figura 6). Após a emissão de novas folhas, foram feitas adubações com os fertilizantes Foliares Viva<sup>®</sup> e Hidrofert<sup>®</sup> Concime CE 8-40-8.



Figura 6. Aclimação das plantas de bananeiras das variedades Jangada, Grande Naine, IAC 2001 e Nanicão Comum em casa de vegetação pertencente ao Laboratório de Biotecnologia Vegetal.

Um resumo das etapas do processo de micropropagação *in vitro* da bananeira e o tempo médio para obtenção das mudas encontram-se esquematizado na Figura 7. O tempo médio da micropropagação variou de 9 a 11 meses, dependendo das condições climáticas e do tamanho das plantas.

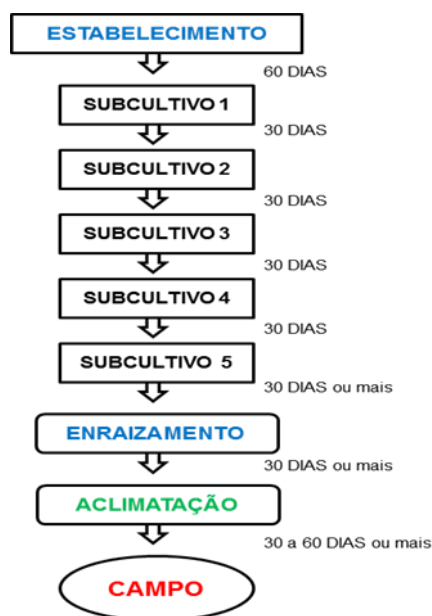


Figura 7. Etapas do processo de micropropagação *in vitro* de bananeira e o tempo médio para obtenção das mudas, conforme o protocolo proposto por Zafari et al., (1994), seguindo as etapas conforme descrito por Alves et al. (2004).

## 2.2. Indexação das plantas micropropagadas.

Para a detecção do CMV e BSV nas plantas de bananeiras micropropagadas, foi utilizado o teste sorológico *Double-antibody sandwich-ELISA* (DAS-ELISA), conforme as recomendações do fabricante.

Foram utilizados anticorpos policlonais comerciais Agdia® para o CMV e, para o BSV, o antissoro para o *Sugarcane bacilliform virus* (SCBV), recomendado pelo fabricante, também para a detecção do BSV por serem sorologicamente relacionados. Como controle negativo, foram utilizadas folhas de bananeiras sadias e, como controle positivo, folhas de bananeiras infectadas com o CMV e com o BSV.

Foram indexadas 53 mudas de bananeiras micropropagadas *in vitro*, sendo 31 amostras da variedade Grande Naine, 6 amostras da variedade Nanicão comum, 8 amostras da

variedade Jangada, 4 amostras da variedade IAC 2001 e 4 amostras da variedade Maçã adquiridas de uma empresa de comercialização de mudas.

O antissoro (IgG) foi diluído na proporção de 1:200, em tampão carbonato 0,05 M (1,59 g de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 2,93 g de NaHCO<sub>3</sub>, 0,2 g de NaN<sub>3</sub>, pH 9,8), sendo depositado 100 µL em cada orifício da placa de poliestireno. A placa foi incubada por 18 horas em geladeira à 4°C. Após esse período, a placa foi lavada com tampão PBS 1X-Tween (8,0 g de NaCl, 0,2g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1,1 g de NaHPO<sub>4</sub>, 0,2 g de KCL, pH 7,4 com Tween 20%) por três vezes de 3 min. Em seguida, folhas de bananeiras foram maceradas na proporção de 1:10 (g/mL) em tampão geral de extração – GEB [PBST 1X com adição de 1,3 g de sulfito de sódio, 20,0 g de PVP (polivinilpirolidone), 0,2 g de azida de sódio, 2,0 g de albumina de ovo em pó e 20,0 g de Tween, pH 7,4]. Dos extratos vegetais brutos obtidos foram depositados 100 µL em cada orifício da placa, a qual foi incubada por 2 horas em temperatura ambiente. Após, procedeu-se a uma nova lavagem com o tampão PBS 1X-Tween e adição de 100 µL do conjugado enzimático (anti-IgG) diluído na proporção 1:200 em tampão ECI [PBST 1X com adição de 2,0 g de BSA (soro albumina bovina), 20,0 g de PVP (polivinilpirolidone) e 0,2 g de azida de sódio, pH 7,4].

A placa foi novamente incubada por 2 horas sob temperatura ambiente e, após a lavagem, foram adicionados 100 µL do substrato nitrofenil fosfato (Sigma<sup>®</sup>) preparado na concentração de 1 mg/mL em tampão substrato (97 mL de dietanolamina e 0,2 g de NaN<sub>3</sub>, pH 9,8). Por fim, a placa permaneceu em temperatura ambiente por 60 min e realizou-se a leitura em leitor de ELISA (*ELISA VERSA Max tunable, Microplate reader (Molecular Devise<sup>®</sup>)*) no comprimento de onda de 405 nm. Todas as amostras foram testadas em triplicata, sendo consideradas positivas as amostras que apresentaram resultados de leituras de absorbância, da média das triplicatas, igual ou superior a duas vezes o valor da duplicata da planta sadia.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Os resultados obtidos após a padronização do método de micropropagação *in vitro*, estão apresentados na Tabela 3. No total, foram produzidas 802 plantas, a partir de 84 gemas apicais iniciais, com uma média geral de 9 plantas por gema.

Tabela 3. Resultados obtidos após a padronização do método de micropropagação *in vitro*, utilizando explantes de bananeiras do grupo Cavendish, em 5 subcultivos.

Variedades de bananeiras	Número de gemas			Nº de brotos	Nº de brotos por gema apical
	Iniciais	Oxidadas	Contaminadas*		
Grand Naine	14	3	2	456	32
Nanicão Comum	6	2	0	213	35
Jangada	58	22	0	120	2
IAC 2001	6	2	0	13	2
Total	84	29	2	802	9

\*Gemas contaminadas com fungos e bactérias.

Proporcionalmente ao número inicial de gemas utilizadas, o número de gemas oxidadas representou cerca de 1/3 do total para todas as variedades. Esta alta taxa de oxidação provavelmente estaria relacionada ao estágio fisiológico dos perfilhos no momento das coletas.

A oxidação, que é causada pela reação das polifenoxidasas sobre compostos fenólicos, pode ocasionar a morte dos ápices caulinares nas fases iniciais de desenvolvimento ou prejudicar o desempenho da fase de multiplicação. A intensidade de oxidação pode ser atribuída às características intrínsecas do genótipo testado (SOUZA et al., 2000). Assim, a utilização de diversos antioxidantes na bananeira pode ser uma alternativa para a diminuição do processo de oxidação, evitando perdas na produção de mudas.

No processo de aclimação das plantas, foi observado que algumas murcharam e isso deve ter corrido devido às mudanças drásticas de ambiente, pois saíram de um meio de cultura, mantido em uma sala de crescimento com fotoperíodo controlado, e passaram para uma casa de vegetação com alterações na luminosidade, temperatura e umidade (Figura 8A). Porém, após a fase inicial, de aproximadamente 60 dias, as mudas se restabeleceram e se desenvolveram satisfatoriamente com um bom crescimento e enraizamento, apresentando folhas verdes bem desenvolvidas (Figura 8B).

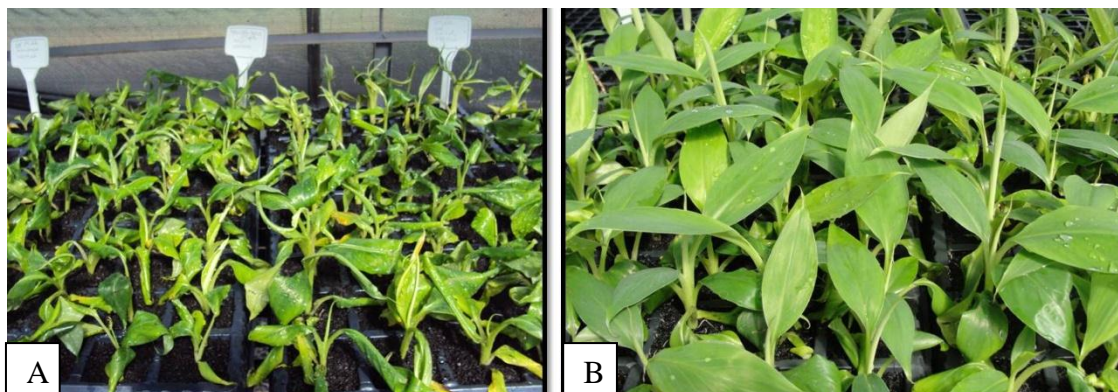


Figura 8. Plantas de bananeiras das variedades Jangada aclimatadas em casa de vegetação. A: plantas após o transplante. B: mudas após 60 dias de aclimação.

Porém, 118 plantas apresentaram *in vitro* características morfológicas diferentes das demais plantas, apresentando uma coloração verde clara, com um caule engrossado e alongado com pouca quantidade de folhas (Figura 9A). O sistema radicular também apresentou diferenças, devido à pouca quantidade de raízes desenvolvidas *in vitro*. Na Figura 9, pode-se observar a diferença entre as plantas.

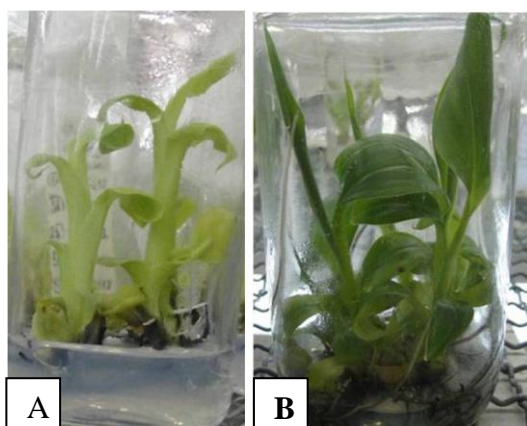


Figura 9. Comparação entre as plantas de bananeiras produzidas *in vitro*. A: plantas com características anormais, com coloração verde claro e caule engrossado e alongado. B: plantas desenvolvidas com coloração verde escuro intenso.

Das 802 plantas produzidas, as 118 plantas que apresentaram características variantes, foram sendo separadas e aclimatadas em bandejas de plástico da mesma forma que as plantas normais, porém, em torno de sete dias após serem transplantadas, estas murcharam

e apresentaram uma coloração amarelada com aspecto de queimado (Figura 10A). Trinta dias depois cerca de 30 plantas morreram e o restante conseguiu se restabelecer com novas brotações verdes (Figura 10B) e, com o passar do tempo, estas cresceram e se desenvolveram como as plantas normais.

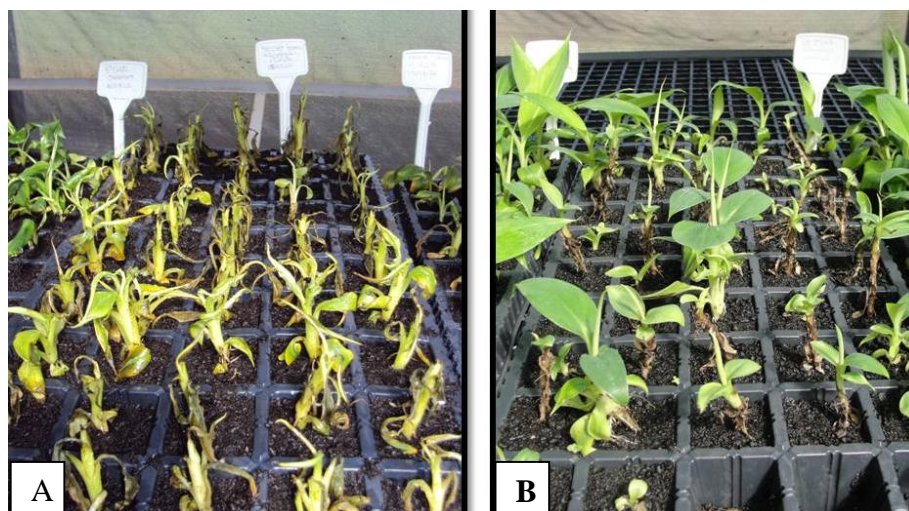


Figura 10. Plantas de bananeiras da variedade Jangada em bandejas plásticas. A: plantas com coloração amarelada e aspecto queimado, alguns dias após a aclimação. B: plantas com 30 dias após serem transferidas para bandejas plásticas, com emissão de novas brotações.

A micropropagação conduzida a partir de rizomas de tamanho padronizado resultou na produção de 2851 plantas, partindo-se de 67 gemas apicais iniciais viáveis, com uma média de 42 plantas/gema, com taxa de multiplicação ente 1,94 a 3,21.

O grupo 3, que compreende os rizomas com tamanho entre 50 a 59 cm, do tipo chifre, foram os que produziram o maior número de gemas viáveis (86%) (Tabela 4). O grupo 1, que compreende os rizomas com tamanho entre 20 a 39 cm, do tipo chifrinho, também apresentou uma grande quantidade de gemas viáveis, ou seja, 72% das 39 gemas iniciais. O grupo 4, com rizomas maiores que 60 cm de tamanho, do tipo chifrão, apresentou 55% de gemas viáveis. A porcentagem de gemas viáveis obtidas no grupo 2, rizomas de 40 a 49 cm, do tipo chifre, foi a de menor taxa (31%). Todavia, neste grupo, o número de gemas oxidadas foi muito superior ao verificado nos demais. Talvez, neste estágio de desenvolvimento, medidas preventivas para se evitar a oxidação excessiva devam ser redobradas para que não



haja o comprometimento da produção de mudas obtidas a partir das gemas provenientes desse padrão de perfilhos.

Tabela 4. Número de gemas oxidadas, número e porcentagem de gemas viáveis nos quatro diferentes grupos de rizomas de bananeiras da variedade Jangada.

Grupos de rizomas	Nº de gemas iniciais	Tamanho (cm)	Nº gemas oxidadas	Nº gemas viáveis	% de gemas viáveis
Grupo 1	39	20 a 39	11	28	72
Grupo 2	35	40 a 49	24	11	31
Grupo 3	21	50 a 59	3	18	86
Grupo 4	18	≥ 60	8	10	55
Total geral	113	-	46	67	59

Assim, concluímos que perfilhos medindo de 20 a 60 cm proporcionaram os melhores rendimentos de gemas viáveis para a micropropagação e, para um melhor resultado, deve-se evitar a utilização de perfilhos que excedam este tamanho.

O número de brotos emitidos após o 2º, 3º e 4º subcultivo e a média de brotos por gema apical para cada grupo também foram analisadas. O grupo 1 foi o que apresentou o maior número de brotos emitidos para os três subcultivos analisados, sendo que, do subcultivo 2 para o subcultivo 3, foi obtida uma taxa de multiplicação de 2,75 brotos; e no subcultivo 3 para o subcultivo 4, essa taxa de brotações foi de 2,64. As 28 gemas apicais viáveis geraram até o 4º subcultivo uma produção de 1.365 plantas de bananeiras, com uma média de 48 mudas por gema (Tabela 5).

Tabela 5. Fator de multiplicação dos brotos nos subcultivos 2, 3 e 4, e média de brotos por rizoma para os 4 grupos de bananeiras da variedade ‘Jangada’.

Grupos de bananeiras	Fator de multiplicação				N° de brotos por gema
	1°	2°	3°	4°	
Grupo 1	2,0	3,4	2,75	2,64	48
Grupo 2	1,8	3,2	2,44	2,33	33
Grupo 3	2,0	4,6	2,57	1,97	46
Grupo 4	1,7	2,5	3,21	2,41	28
Total Geral	1,9	3,4	2,67	2,33	42

Para o grupo 3, as 18 gemas apicais iniciais geraram até o 4° subcultivo, 828 mudas, com uma média de 46 mudas por gema, sendo que, do 2° para o 3° subcultivo, a taxa de multiplicação foi 2,57 e do 3° para o 4° subcultivo, a taxa de multiplicação foi de 1,94. Enquanto que os grupos 2 e 4 apresentaram as menores quantidades de brotos emitidos no 4° subcultivo, sendo respectivamente de 371 mudas, com média de 33 mudas por gema e 287 mudas, com média de 28 mudas por gema. Porém, do subcultivo 2 para o 3, o grupo 4 apresentou a maior taxa de multiplicação sendo de 3,21.

Os resultados obtidos podem ser melhor visualizados através da Figura 11, que representa o número de brotos de bananeiras da variedade Jangada, emitidos nos subcultivos 2, 3 e 4 para cada grupo separadamente. Com isso, pode-se concluir que os melhores resultados para a obtenção de mudas foram obtidos no grupo 1, com os rizomas de tamanho entre 20 a 39 cm, seguidos pelos grupos 3 com tamanho entre 50 a 59 cm, grupo 2 com tamanho entre 40 a 49 cm, e grupo 4, maiores que 60 cm de tamanho.

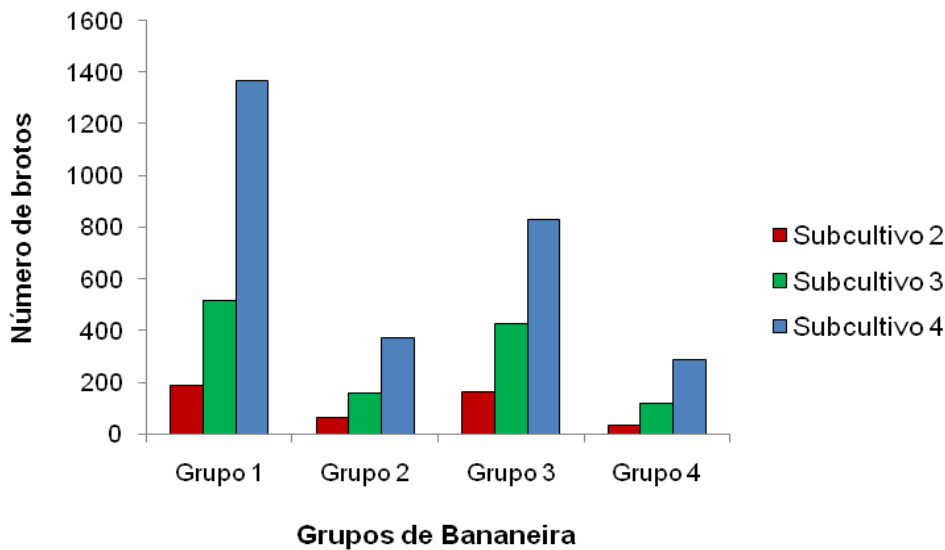


Figura 11. Número de brotos de bananeiras da variedade Jangada emitidos nos subcultivos 2, 3 e 4 para os grupos, 1, 2, 3 e 4.

Carvalho et al. (2012), em trabalhos de produção de mudas micropropagadas de bananeira, utilizaram seis subcultivos sucessivos, com a utilização de 2,5 mg/L de BAP, sendo esta a mesma concentração utilizada neste trabalho. Os autores relataram que a taxa média de multiplicação variou em função da cultivar utilizada, por exemplo, para a cultivar *Williams*, variedade do grupo Cavendish, a taxa de multiplicação foi de 3,5; para as do grupo Prata, como Prata Catarina, Prata Anã e Maçã, os índices foram de 3,0; 2,6 e 2,9 respectivamente; e para a variedade Tropical (genoma AAAB), a taxa de multiplicação foi de 3,3. O número médio de mudas micropropagadas ao final da etapa de alongamento e enraizamento foi de 170 mudas por ápice caulinar estabelecido *in vitro*. Os resultados obtidos neste trabalho estão um pouco abaixo dos valores obtidos por outros pesquisadores. E, como isso, alterações na metodologia podem ser realizadas para aumentar a taxa de multiplicação.

Pode-se inferir também que, como o número de brotos geralmente dobra de um subcultivo para o outro, como demonstrado nos dados da Tabela 5, acredita-se que, até o final do 6º subcultivo, possam ser produzidas em média de 115 a 195 mudas de bananeira por ápice caulinar. Esses resultados estão próximos aos valores descritos por Santos-Serejo et al. (2006), os quais obtiveram uma média de 150 a 300 mudas de bananeira por ápice caulinar, enquanto que, Carvalho et al. (2012) produziram 170 mudas por ápice caulinar. O número final de mudas de bananeira obtidas a partir de ápice caulinar, submetido a seis subcultivos, é muito variável em função do genótipo da cultivar ou variedade, do meio de cultura utilizado,

das condições de crescimento e do sistema de propagação adotado (CARVALHO et al., 2012).

### 3.1. Análise estatística

Em todos os subcultivos, houve diferença significativa da média de brotos por gema apical para os 4 grupos testados. No subcultivo 2, o grupo 3 foi o que produziu a maior quantidade de brotos, com a média de 11 brotos por gema, seguido respectivamente pelos grupos, 1, 2 e 4 (Tabela 6).

Para o subcultivo 3, o grupo 3 também foi o que apresentou a maior proliferação de brotos com média de 31,5 brotos por gema. Os grupos 2 e 4 não diferiram estatisticamente entre si. E no subcultivo 4, o grupo que apresentou a maior quantidade de brotos foi o 1, com média de 78,1 brotos por gema apical e taxa de multiplicação de 2,96, seguidos pelo grupo 3, 2 e 4.

Tabela 6. Média de brotos obtidos por gema apical nos subcultivos 2, 3 e 4 para os 4 grupos de bananeiras da variedade Jangada.

Grupos de bananeiras	Média de brotos por gema		
	2° Subcultivo <sup>1</sup>	3° Subcultivo <sup>1</sup>	4° Subcultivo <sup>1</sup>
Grupo 1	8,4 b	26,4 b	78,1 a
Grupo 2	6,2 c	15,9 c	36,1 c
Grupo 3	11,0 a	31,5 a	66,4 b
Grupo 4	4,0 d	14,4 c	31,0 c
Média Geral	7,4	22,05	52,9
CV (%)	25,6	18,65	20,16

<sup>1</sup>A mesma letra minúscula nas colunas não difere entre si pelo teste de agrupamento Scott-Knott a 5% de significância.

Os resultados obtidos podem ser melhor visualizados através da Figura 12, que representa a média de brotos emitidos por gema da variedade Jangada, nos subcultivos 2, 3 e 4, para cada grupo separadamente.

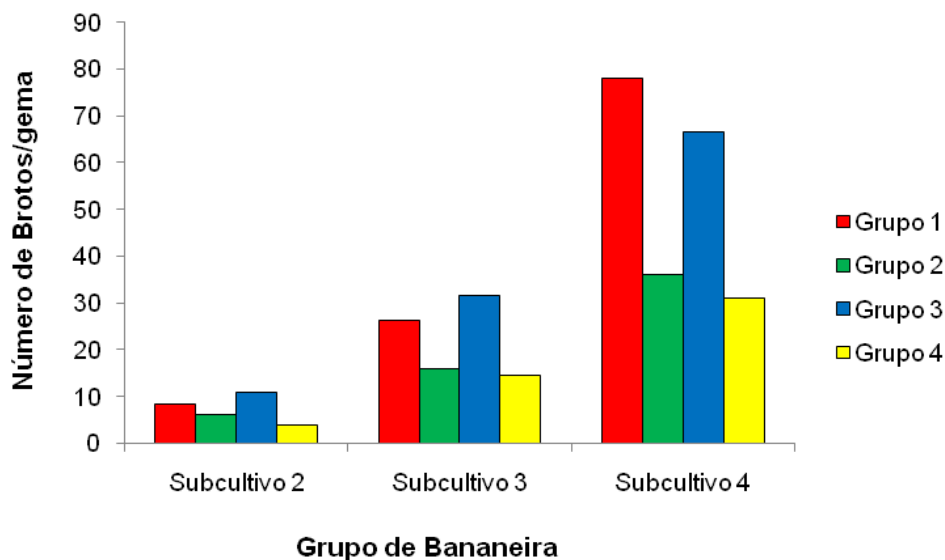


Figura 12. Média de brotos emitidos por gema apical, da variedade de bananeira Jangada, nos subcultivos 2, 3 e 4 a partir dos grupos 1, 2, 3 e 4, cultivados no meio de cultura MS.

### 3.2. Detecção sorológica do CMV por DAS-ELISA

Segundo Brioso et al. (2000), as bananeiras podem estar infectadas com o BSV e com o CMV ao mesmo tempo, ou seja, com infecção mista. Assim, algumas mudas produzidas *in vitro* foram indexadas, mediante a utilização do método sorológico DAS-ELISA. Para a detecção do BSV, foi utilizado o antissoro comercial recomendado para a detecção do *Sugarcane bacilliform virus* (SCBV), pois segundo Lockhart e Autrey (1988), os anticorpos produzidos contra o SCBV podem ser sorologicamente relacionados com o BSV, uma vez que antissoros produzidos a partir do BSV não são comercializados.

Das 53 amostras testadas, de bananeiras micropropagadas *in vitro*, das variedades Grand Naine, Nanicão comum, Jangada e IAC 2001 do grupo Cavendish e da variedade Maçã, 4 se mostraram infectadas pelo CMV e 25 com o BSV. Chamou atenção o fato de que apenas plantas da variedade Maçã se mostraram infectadas com ambos (Tabela 7).

Tabela 7. Detecção do CMV e do BSV em variedades de bananeiras micropropagadas *in vitro* por meio do teste sorológico DAS-ELISA.

Variedades de bananeiras	N° de amostras	N° de amostras positivas			Plantas sadias (%)
		CMV	BSV	CMV e BSV	
Grand Naine	31	0	14	0	55
Nanicão comum	6	0	2	0	67
Jangada	8	0	3	0	62
IAC 2001	4	0	2	0	50
Maça*	4	4	4	4	0
Total	53	4	25	4	53

\* Plantas provenientes da micropropagação adquiridas de uma empresa de comercialização de mudas.

#### 4. CONCLUSÕES

Através dos resultados obtidos, pode-se concluir que o método de micropropagação *in vitro* utilizado foi eficiente para a produção de mudas de bananeiras das variedades Grand Naine, Jangada e Nanicão comum as mais cultivadas no norte do Paraná, sendo fundamental realizar uma seleção criteriosa dos perfilhos para serem utilizados nas etapas posteriores de micropropagação, assim como realizar a indexação das mudas produzidas tanto para o CMV como para o BSV, como garantia futura da sanidade dos bananais.

## 5. REFERÊNCIAS

- ÁLVARES, M. C.; CALDAS, L. S. Crescimento, produção e variação somaclonal em bananeiras micropropagadas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 37, n. 3, p. 415-420, mar. 2002.
- ALVES, E. J.; LIMA, M. B.; SANTOS-SEREJO, J. A.; TRINDADE, A. V. Propagação. In: TRINDADE, A. V. **O cultivo da bananeira**. 21 ed., Cruz das Almas: EMBRAPA-Mandioca e Fruticultura, 2004. p. 59-86.
- 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**, Jaboticabal, v. 26, n. 2, p. 257-259, 2000.
- CHAVES, J. C. M.; CAVALCANTI JUNIOR, A. T.; CORREIA, D. SOUZA.; F. X.; ARAÚJO, C. A. T. **Normas de produção de mudas**. Fortaleza: EMBRAPA-Agroindústria Tropical, 2000. (Documento 41), 37 p.
- CARVALHO, A. C. P. P.; RODRIGUES, A. A. J.; SANTOS, E. O. **Produção de mudas micropropagadas de bananeira**, Fortaleza – Ceará: EMBRAPA-Agroindústria Tropical, 2012 (Circular Técnica, n. 37), 14p.
- CORDEIRO, Z. J. M.; MESQUITA, A. L. M. Manejo integrado das pragas, doenças e plantas daninhas. In: CORDEIRO, Z. J. M. (Org.). **Banana: Fitossanidade**. Cruz das Almas: EMBRAPA-Mandioca e Fruticultura. — Brasília: Comunicação para Transferência de Tecnologia, v.1, p. 15-20, 2000.
- COUCEIRO, M. A.; SIQUEIRA L. D.; PEREIRA, W. E.; NEVES, L. L. M. Crescimento de explantes *in vitro* e de mudas de bananeira cv. Maçã, submetidas a doses de sacarose nas fases de enraizamento e aclimação. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 48, n. 280, p. 615-627, nov/dez. 2001.
- FERREIRA, D.F. **SISVAR**: versão 5.3 (Build 75). Lavras: DEX/UFLA, 2003.
- LOCKHART, B. E. L.; AUTREY L. J. C. Occurrence in sugarcane of a *Bacilliform virus* related serologically to *Banana streak virus*. **Plant Disease**, v. 72, n. 3, p. 230-233, 1988.
- MEISSNER FILHO, P.; BRIOSO, P. S. T. Doenças causadas por vírus. In: CORDEIRO, Z. J. M. (Org.). **Banana: Fitossanidade**. Cruz das Almas: EMBRAPA-Mandioca e Fruticultura. — Brasília: Comunicação para Transferência de Tecnologia, v.1, p. 78-82, 2000.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, p. 473-497, 1962.
- PEREIRA, M. C. T.; NIETSCH, S.; FRANÇA, A. C.; NUNES, C. F.; LIMA, C.; GONÇALVES, V.; SALLES, B. P.; MORAIS, D. L. B.; KOBAYASHI, M. K. Aclimação



de mudas micropropagadas de bananeira sob diferentes condições de luminosidade. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 27, n. 2, p. 238-240, ago. 2005.

SALERNO, A. R.; ZAFFARI, G. R. Micropropagação da bananeira (*Musa* sp. Grupo AAA, subgrupo Cavendish): efeito do espaçamento e empilhamento de recipientes em sala de crescimento. **Revista Brasileira de Fruticultura**. Jaboticabal, v. 21, n. 2, p. 204-207, 1999.

SOUZA, A. S.; CORDEIRO, Z. J. M.; TRINDADE, A. V. Produção de mudas. In: CORDEIRO, J. M. (Org.) **Banana produção: aspectos técnicos**. Brasília, DF: EMBRAPA-Comunicação para Transferência de Tecnologia, 2000. p. 39-46.

ZAFFARI, G. R.; SOLIMAN FILHO, L. F.; STUKER, H. Efeito do tamanho do explante e da quebra de dominância apical, sobre a brotação das gemas laterais na produção de mudas de bananeira, *in vitro*. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 16, n. 3, p. 71-76, 1994.

## CAPÍTULO 3

Caracterização molecular parcial de um isolado do *Cucumber mosaic virus* detectado em bananeiras no norte do Paraná.

Caracterização molecular parcial de um isolado do *Cucumber mosaic virus* detectado em bananeiras no norte do Paraná.

**RESUMO**

O objetivo desse trabalho foi de detectar e identificar o agente causal associado aos sintomas de mosaico em bananeiras cultivadas na região de Novo Itacolomi-PR. Para isso, foram inoculadas algumas plantas relatadas como hospedeiras do CMV e realizados testes sorológicos DAS-ELISA e o molecular, RT-PCR. Um isolado viral foi identificado como sendo o CMV, que infectou 10 de 13 espécies vegetais testadas, principalmente *Cucurbitaceae* e *Solanaceae*, além da bananeira. Seis de um total de 16 rizomas coletados estavam infectados pelo CMV através do DAS-ELISA. Para a detecção do vírus através da RT-PCR, o melhor método de extração do RNA total de plantas foi a combinação do reagente Trizol<sup>®</sup> com o tampão CTAB. Um dos produtos de RT-PCR, de 500 pb, obtido nas ampliações foi sequenciado, apresentando similaridade acima de 94% com outras sequências de CMV de bananeiras depositadas no GenBank. Enquanto que a análise filogenética realizada permitiu o posicionamento desse isolado no subgrupo IA do CMV.

**Palavras-chave:** *Musa* spp., CMV, *Cucumovirus*, DAS-ELISA, RT-PCR.

Partial molecular characterization of an isolate of *Cucumber mosaic virus*  
infecting banana in northern Parana.

**ABSTRACT**

The objective of this study was to partially characterize a virus isolate associated with mosaic symptoms in banana from producing areas of Novo Itacolomi-PR, through DAS-ELISA and RT-PCR. The virus isolate infected 10 out of 13 species listed as hosts for CMV, primarily *Cucurbitaceae* and *Solanaceae*, besides the banana. Six out of a total of 16 rhizomes were CMV-infected as indicated DAS-ELISA tests. For virus detection by RT-PCR, the best method for total RNA extraction from plants was the combination of Trizol<sup>®</sup> reagent with CTAB buffer. One of the amplified RT-PCR products of 500 bp was sequenced, showing similarity over 94% with other CMV banana sequences deposited in GenBank, while phylogenetic analyzes allowed the positioning of this isolate in subgroup IA of CMV.

**Key-words:** *Musa* spp.. CMV. *Cucumovirus*. DAS-ELISA. RT-PCR.

## 1. INTRODUÇÃO

Com o avanço tecnológico da produção comercial de bananas, houve um grande aumento da procura de mudas, principalmente clonais obtidas a partir de poucas matrizes. Com isso, ficou evidente a importância da utilização de matrizes sadias para evitar a propagação do vírus. Uma vez que, não existindo métodos rápidos e baratos para a eliminação de vírus, é necessário que sejam tomadas medidas preventivas para evitar a infecção nos plantios (MEISSNER FILHO; BRIOSO, 2000).

Dentre as viroses que infectam a bananeira, encontra-se o *Cucumber mosaic virus* (CMV), um vírus de ocorrência natural que infecta ampla gama de hospedeiras em todo o mundo, estando presente em países de diferentes regiões geográficas e de condições climáticas distintas. Pertencente à família *Bromoviridae* e ao gênero *Cucumovirus*, é um vírus isométrico com diâmetro entre 28 e 30 nanômetros, composto por 180 subunidades protéicas idênticas que formam o capsídeo. Apresenta um genoma composto por três segmentos de RNA de fita simples positiva, além de um quarto segmento subgenômico, que codifica a proteína capsidial (PALUKAITIS et al., 1992).

Por apresentar uma ampla variabilidade genética, e de acordo com características moleculares e de hospedeiras diferenciadoras, suas estirpes são classificadas em dois subgrupos denominados de CMV-I e CMV-II, (PALUKAITIS et al., 1992). Segundo Daniels e Campbell (1992), o subgrupo CMV-I foi subdividido em IA e IB conforme os sintomas induzidos em plantas de *Vigna unguiculata*, no qual o sintoma de mosaico sistêmico é atribuído ao subgrupo IA e o sintoma de lesão local necrótica ao IB. No Brasil, foram identificados isolados do CMV, pertencentes ao subgrupo IA, nos estados de Minas Gerais, Rio de Janeiro, Pernambuco, e Pará (EIRAS et al., 2001).

Com a expansão do uso de plantas micropropagadas *in vitro*, tem-se registrado maior dispersão do CMV do que no passado, sendo detectada maior ocorrência nas cultivares do subgrupo Cavendish, mas também é constatada em variedades do subgrupo Prata e Terra. Os bananeiros são atacados na fase vegetativa, isto é, antes do florescimento (FANCELLI; MESQUITA, 2000).

No Brasil, a primeira ocorrência do CMV em bananeira foi descrita em São Paulo, sendo observados sintomas de mosaico, necrose e até morte da planta (SILBERSCHMIDT; NÓBREGA, 1941). Posteriormente, outros autores caracterizaram isolados de CMV tanto de bananeira como de outras espécies vegetais. Eiras et al. (2001) realizaram a caracterização

parcial de um isolado do vírus do mosaico do pepino obtido de bananeira e relataram a ocorrência do CMV, pertencente ao subgrupo IA, na região do Vale do Ribeira no Estado de São Paulo.

Segundo Figueiredo e Brioso (2007), a situação atual da cultura da banana no Brasil e no mundo necessita de medidas preventivas de controle de doenças. Assim, o desenvolvimento de uma metodologia de indexação eficiente, sensível e rápida, que permita a pronta identificação de cultivares infectadas com estirpes virais já existentes no território nacional, impediria o escape e o trânsito de mudas infectadas obtidas ou não por cultura de tecidos. Tal medida diminuiria a possibilidade de perdas na produtividade da bananeira em função de infecção viral simples ou mista causada pelos vírus CMV e BSV.

As viroses que infectam a bananeira também acabam restringindo o intercâmbio de germoplasma da cultura. Muitas vezes, variedades de bananeira produzidas pelo melhoramento genético podem estar infectadas, necessitando assim, a realização de métodos seguros de indexação antes de sua distribuição (SILVEIRA et al., 2004).

O objetivo desse trabalho foi detectar e identificar o agente causal associado aos sintomas de mosaico em bananeiras cultivadas na região de Novo Itacolomi-PR.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

Amostras foliares foram coletadas em um bananal na região de Novo Itacolomi, norte do Paraná, onde plantas individuais apresentavam sintomas de mosaico, sugerindo uma infecção por CMV (Figura 1).



Figura 1. Sintomas de mosaico e estrias cloróticas observados em folhas de bananeiras da variedade Jangada, provenientes do Município de Novo Itacolomi-PR.

A fim de se confirmar a identidade viral, foram coletadas amostras foliares e rizomas de 15 plantas da variedade Jangada, sendo os rizomas plantados em vasos e mantidos em casa de vegetação para servirem como fonte de inóculo. Também foram coletadas folhas e rizomas de plantas sem sintomas. Amostras foliares de uma planta da variedade Maçã, sem sintomas, obtida por micropropagação e adquirida de uma empresa comercial, também foram coletadas. As amostras foram acondicionadas em sacos plásticos e mantidas a 4°C.

### 2.1. Inoculação mecânica experimental do isolado viral obtido de bananeira

Como uma das etapas do processo de identificação viral, o inóculo obtido de bananeiras foi inoculado mecanicamente em algumas espécies listadas como hospedeiras do CMV, com quatro repetições por espécie vegetal, sendo uma testemunha de cada espécie mantida sem inoculação (Tabela 1).

Tabela 1. Relação das espécies de plantas inoculadas mecanicamente com o isolado viral de bananeira.

Famílias	Espécies testadas
<i>Amaranthaceae</i>	<i>Gomphrena globosa</i>
<i>Apocynaceae</i>	<i>Catharanthus roseus</i>
<i>Chenopodiaceae</i>	<i>Chenopodium amaranticolor</i>
<i>Cucurbitaceae</i>	<i>Cucumis anguria</i> ; <i>C. sativus</i> ; <i>C. melo</i> cv. ‘Sunrise’; <i>Cucurbita pepo</i> cv. ‘Caserta’; <i>C. moschata</i> Duch
<i>Fabaceae</i>	<i>Vigna unguiculata</i>
<i>Solanaceae</i>	<i>Nicotiana benthamiana</i> ; <i>N. debney</i> ; <i>N. edwardsonii</i> ; <i>N. glutinosa</i> ; <i>N. tabacum</i> ; <i>Petunia hybrida</i> ; <i>Lycopersicum esculentum</i>

As folhas foram maceradas em tampão fosfato de sódio 0,02M ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 + \text{NaH}_2\text{PO}_4 + \text{Na}_2\text{SO}_3$ ), pH 7,0 na diluição 1:10 (p:v), e o extrato bruto vegetal inoculado nas plantas previamente polvilhadas com carvão ativado em pó (Synth<sup>®</sup>) utilizado como abrasivo. Após a inoculação, as folhas foram lavadas com água para retirar o excesso de inóculo com o abrasivo e permaneceram em casa de vegetação até a manifestação dos sintomas.

## 2.2. Detecção e identificação do isolado viral obtido de bananeira pelo teste sorológico DAS–ELISA

Por meio dos sintomas observados nas plantas utilizadas na determinação da gama de hospedeiras, pode-se inferir inicialmente que o isolado viral poderia ser o CMV. Como etapa seguinte do processo de identificação, foi realizado o teste sorológico DAS-ELISA, utilizando antissoros comerciais para o CMV, subgrupos I e II, sendo novamente testadas as 16 amostras foliares de bananeiras.

O teste foi realizado conforme as recomendações do fabricante (Agdia<sup>®</sup>), sendo utilizados como controle negativo folhas de bananeiras sadias e, como controle positivo, folhas de bananeiras comprovadamente infectadas com o CMV. O protocolo utilizado foi o mesmo descrito no capítulo 2 (item: 2.2. Indexação das plantas micropropagadas).



### 2.3. Identificação molecular do isolado viral

Nos ensaios de RT-PCR para a detecção viral, foram testadas as seguintes plantas: bananeiras da variedade Jangada, amostras número 1, 2 e 7, com sintomas de infecção viral e positivas no teste DAS-ELISA para o CMV, e amostra número 6, sem sintomas, e negativa no teste DAS-ELISA; plantas de abóbora ‘Caserta’ sadia e inoculada com um isolado do CMV previamente identificado; três amostras da variedade Grande Naine micropropagadas *in vitro* e negativas para o CMV pelo teste DAS-ELISA; e uma amostra da variedade Maçã, também micropropagada *in vitro* e positiva para o CMV pelo teste DAS-ELISA.

#### 2.3.1. Extração do RNA total de plantas

Como a bananeira é uma planta com grande quantidade de compostos fenólicos e/ou polissacarídeos em seus tecidos, que podem comprometer a extração e purificação das moléculas de RNA, foram testados dois métodos de extração. O primeiro utilizando somente o reagente Trizol<sup>®</sup> e o segundo utilizando a combinação do reagente Trizol<sup>®</sup> com o detergente catiônico CTAB (brometo de cetil-trimetilamônio).

- **Método de Extração com Trizol<sup>®</sup>:** A extração do RNA total foi realizada utilizando o reagente Trizol<sup>®</sup> (Life Technologies<sup>®</sup>), seguindo o protocolo do fabricante. Para isso, folhas de bananeiras foram maceradas em nitrogênio líquido e transferidas para microtubos de 1,5 mL. Rapidamente, foi adicionado 1 mL de Trizol nas amostras, homogeneizando-as em vortex por 1 min; em seguida, foram incubadas à temperatura ambiente por 5 min. Após isso, adicionou-se 200 µL de clorofórmio, com homogeneização em vortex por 15 seg e logo centrifugadas a 12.000 rpm por 15 min à 4°C. O sobrenadante formado foi transferido para um novo microtubo e adicionou-se 500 µL de álcool isopropílico. As amostras foram incubadas por 10 min à temperatura ambiente e posteriormente centrifugadas a 12.000 rpm por 10 min à 4°C. O sobrenadante formado foi descartado e o RNA precipitado (“pellet”) foi lavado com 1 mL de etanol 75%, homogeneizando em vortex, seguido de uma nova centrifugação à 7.500 rpm por 5 min a 4°C. Descartou-se o sobrenadante e o “pellet” formado no fundo do microtubo foi seco por 10 min em temperatura ambiente. Finalmente, ressuspendeu-se o “pellet” em 30 µL de água DEPC, com posterior incubação a 55°C por 10

min. O RNA extraído das amostras foi armazenado à -20°C para serem utilizadas nas reações de RT-PCR.

**- Método de Extração com CTAB e Trizol:** 0,4 g. de folhas de bananeiras foram maceradas em nitrogênio líquido, com posterior adição de 3 mL de tampão de extração [100 mM Tris-HCl pH 8,0, 50 mM EDTA (ácido etileno diamono tetracético), 1,4 M NaCl, 80 mM Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>, 2% PVP (polivinilpirrolidone) e 2% CTAB (brometo de cetiltrimetilamônio), conforme descrito por James et al., (2011)], e transferidas para tubos eppendorf de 1,5 mL. As amostras foram incubadas a 65°C por 30 min com agitações a cada 10 min; posteriormente, adicionou-se 1 volume de trizol com agitação manual por 10 min. Centrifugou-se por 10 min a 8.000 rpm à 4°C e o sobrenadante foi transferido para um novo tubo. A extração com trizol foi repetida com agitação manual dos tubos por 10 min e uma centrifugação a 8.000 rpm por 10 min à 4°C. Em seguida, foi adicionado 0,6 volume de isopropanol gelado, sendo misturado suavemente por inversão do tubo. Uma nova centrifugação foi realizada a 12.000 rpm por 20 min à 4°C e o sobrenadante formado foi descartado. O precipitado formado no fundo do tubo foi lavado com etanol 70% e centrifugado a 7.500 rpm por 5 min à 4°C. O “pellet” foi seco por 10 min em temperatura ambiente, ressuspendido em 30 µL de tampão TE (Tris-HCl 10 mM, pH 8,0; EDTA 1 mM), e incubado a 55°C por 10 min. O RNA extraído das amostras foi armazenado à -20°C para serem utilizados nas reações de RT-PCR.

Os RNAs obtidos pelos dois métodos de extração foram quantificados através do Fluorômetro Qubit<sup>®</sup> 2.0, utilizando os kits Qubit<sup>®</sup> RNA Assay Kit, da Life Technologies<sup>®</sup>. Os limites mínimo e máximo de RNA captados pelo aparelho são, respectivamente, 2 e 100 ng/µL. Assim, as amostras com os maiores valores foram utilizadas para os procedimentos descritos abaixo.

### 2.3.2. Reação de Transcrição Reversa (RT)

Inicialmente, procedeu-se a reação de transcrição reversa para obtenção do DNA complementar (cDNA), utilizado o *primer* CMV 1 (5' GCC GTA AGC TGG ATG GAC AA 3'), que anela na região não traduzível do terminal 3' do RNA 3 (nucleotídeo 2019 ao 2038; senso complementar) e detecta vírus do gênero *Cucumovirus* (WYLIE et al.,1993).

Para isso, adicionou-se em microtubos de 0,2 mL, 3 µL do RNA total e 2 µL do *primer* CMV I, na concentração de 10 mM; em seguida, as amostras foram aquecidas à 65°C

por 5 min e resfriadas rapidamente no gelo. Após essa etapa, acrescentou-se 4 µL de 5X *First-strand Buffer* (250 mM Tris-HCl, 375 mM KCl, 15 mM MgCl<sub>2</sub>), 2 µL de dNTPs (dGTP, dATP, dCTP, dTTP) à 10 mM, 2 µL de DTT (ditiotreitól), 1 µL da enzima transcriptase reversa (M-MLV-RT - *Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase*) (200 U), completando a reação com 6 µL de água DEPC. As amostras foram incubadas a 37°C por 50 min.

### 2.3.3. Reação de PCR

O cDNA produzido *in vitro* foi utilizado na reação de PCR, utilizando, além do *primers* CMV 1 que anela na região não traduzível do terminal 3' do RNA 3 (nucleotídeo 2019 ao 2038; senso complementar), o *primers* CMV 2 (5' TAT GAT AAG AAG CTT GTT TCG CG 3'), que anela na ORF que codifica a capa protéica (nucleotídeo 1551 ao 1573; senso viral) (WYLIE et al.,1993).

Para a reação, foram utilizados 5 µL do cDNA, 5 µL de tampão 10X PCR *Buffer* (200 mM Tris-HCl, 0.1 mM EDTA, 1 mM DTT, 50% (v/v) glicerol), 3 µL de cloreto de magnésio (MgCl<sub>2</sub>) 50 mM, 2 µL de dNTPs mix (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) à 10 mM, 2 µL do *primer* CMV 1, 2 µL do *primer* CMV 2 na concentração de 10 mM, 1 µL da enzima *Taq* DNA polimerase (Invitrogen<sup>®</sup>) e 30 µL de água DEPC. As amplificações foram realizadas em termociclador (Techne; modelo TC- 512), com desnaturação inicial a 92°C por 3 min, seguido de 35 ciclos de amplificação a 95°C por 1 min (desnaturação), 60°C por 1 min (anelamento) e 72°C por 1,5 min (extensão), seguido de extensão final a 72°C por 10 min, segundo o protocolo proposto por Wylie et al. (1993).

O produto de PCR foi aplicado em um mini gel de agarose a 1,2%, preparado em tampão TAE 1X [Tris 0,04 M, acetato de sódio 0,02 M e ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) 0,0001 M, pH 8,3], e corado com 0,25 x SYBR<sup>®</sup> *Safe DNA Gel Stain* (Invitrogen<sup>®</sup>). Após a corrida de eletroforese horizontal durante 45 min a 85 volts, os fragmentos obtidos no gel foram visualizados sob luz ultravioleta em fotodocumentador e, para avaliar o tamanho dos fragmentos amplificados, foi utilizado o marcador molecular de 1 Kb Plus DNA *Ladder* (Invitrogen<sup>®</sup>) como padrão.

#### 2.4. Sequenciamento do produto de amplificação por RT-PCR

O produto de DNA obtido foi quantificado, utilizando o marcador *Low DNA Mass Ladder* (Invitrogen®). Posteriormente, os fragmentos amplificados foram diretamente purificados com o kit *Ilustra ExoStar PCR* (GE Health Care®), segundo o protocolo estabelecido pelo fabricante. O kit contém as enzimas fosfatase alcalina e exonuclease I, que, em conjunto, removem *primers* e nucleotídeos não incorporados nas reações de amplificação. Foram adicionados 10 µL do produto de PCR, 2 µL de água DEPC, 1 µL da enzima exonuclease I e 1 µL *Shrimp Alkaline Phosphatase* (SAP). A reação foi incubada a 37°C por 15 min e a 80°C por mais 15 min.

As amostras foram enviadas ao Setor de Sequenciamento de DNA, no Centro de Estudos do Genoma Humano, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo – USP, para sequenciamento. Em cada microtubo de 0,2 mL, foram colocados 5 µL do DNA, com 2,5 µL de cada *primer* (5 µM), *forward* e *reverse*.

O sequenciamento do DNA foi realizado em um sequenciador ABI 3730 DNA Analyzer (*Applied Biosystems*®), um sistema de análise de DNA de 48 capilares. As reações de sequenciamento foram feitas utilizando o *bigDye® Terminator v 3.1 Cycle sequencing Kit* (código 4337456). As corridas foram feitas em capilares de 36 cm, utilizando o polímero POP7. As sequências foram analisadas pelo software *Sequencing Analyses 5.3.1*, utilizando o *Base Caller KB*.

Utilizou-se o método de comparação da sequência obtida com outras sequências de nucleotídeos do CMV depositadas no GenBank ([www.ncbi.nlm.nih.gov/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/)), por meio do programa *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI).

As sequências de nucleotídeos obtidas no NCBI foram alinhadas mediante a utilização do programa Clustal W ([www.ebi.ac.uk/Clustalw](http://www.ebi.ac.uk/Clustalw)). A árvore filogenética foi construída a partir dos alinhamentos utilizando o programa Mega 5.1 beta 2 ([www.megasoftware.net](http://www.megasoftware.net)). As filogenias para cada conjunto de dados foram construídas pelo método de “*Neighbor-Joining*”. Os ramos das árvores foram testados por *bootstrap*, com 1.000 repetições.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Das 16 amostras de bananeiras, provenientes de uma área de produção comercial de banana do Município de Novo Itacolomi-PR, sendo, 15 da variedade Jangada, e uma da variedade Maçã, micropropagada *in vitro*, apenas quatro plantas da variedade Jangada apresentavam sintomas característicos de infecção causada pelo CMV, como mosaico e estrias cloróticas ao longo da folha. As demais amostras não apresentavam sintomas.

#### 3.1. Inoculação mecânica experimental do isolado viral

O isolado viral de bananeira foi inoculado em 13 espécies de plantas. Os sintomas induzidos nas *Cucurbitaceae* inoculadas mecanicamente podem ser observados na Figura 2, sendo, necrose, clorose, mosaico, bolhosidade e amarelecimento foliares, característicos das infecções causadas pelo CMV.

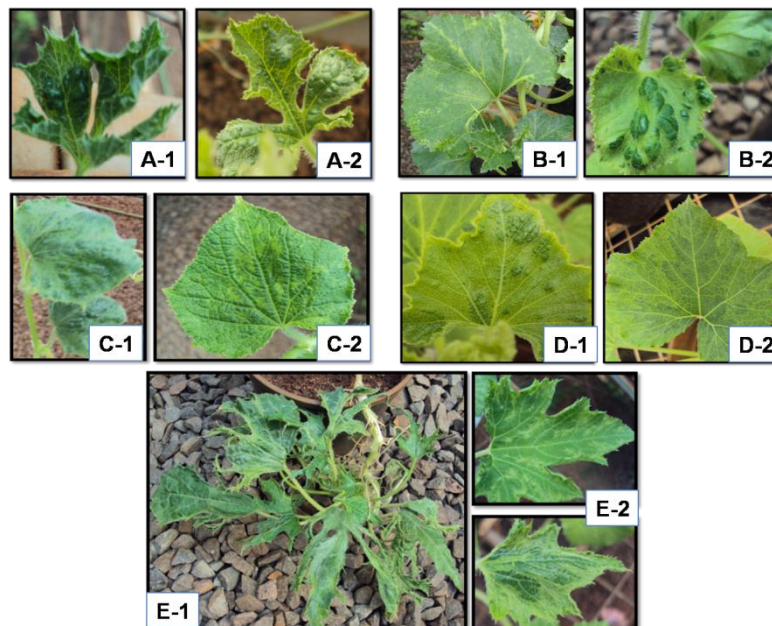


Figura 2. Sintomas induzidos em plantas de: A-1 e A-2: *Cucumis anguria* (Maxixe); B-1 e B-2: *Cucumis melo* cv. 'Sunrise' (Melão); C-1 e C-2: *Cucumis sativus* (Pepino); D-1 e D-2: *Cucurbita moschata* Duch (Abóbora menina); E-1 e E-2: *Cucurbita pepo* cv. 'Caserta' (Abóbora).

Os sintomas observados nas 13 espécies de plantas inoculadas com o isolado de bananeira estão descritos na tabela 2.

Tabela 2. Sintomas induzidos em diferentes espécies de plantas inoculadas com o isolado viral de bananeira proveniente de Novo Itacolomi-PR.

Famílias	Espécies testadas	Sintomas
<i>Amaranthaceae</i>	<i>Gomphrena globosa</i>	Mancha anelar e Clorose foliar
<i>Apocynaceae</i>	<i>Catharanthus roseus</i>	Ausência de sintomas
<i>Chenopodiaceae</i>	<i>Chenopodium amaranticolor</i>	Lesão local clorótica
<i>Cucurbitaceae</i>	<i>Cucumis anguria</i>	Bolhosidade, mosaico e deformação
	<i>Cucumis melo</i> cv. ‘Sunrise’	Bolhosidade e mosaico
	<i>Cucumis sativus</i>	Bolhosidade e mosaico
	<i>Cucurbita pepo</i> cv. ‘Caserta’	Mosaico, afilamento, bolhosidade e redução foliar
	<i>Cucurbita moschata</i> Duch	Bolhosidade e mosaico
<i>Fabaceae</i>	<i>Vigna unguiculata</i>	Ausência de sintomas
	<i>Lycopersicon esculentum</i>	Amarelecimento, bolhosidade e mosaico
	<i>Nicotiana benthamiana</i>	Manchas necróticas e clorose
	<i>N. glutinosa</i>	Ausência de sintomas
	<i>N. tabacum</i>	Mosaico, bolhosidade

Segundo Figueiredo e Brioso (2007), plantas infectadas pelo CMV podem apresentar sintomas de necrose vascular, espessamento intermitente da nervura, separação da bainha foliar externa do pseudocaule, clorose, mosaico, nanismo, má formação dos frutos e, às vezes, morte da planta.

As plantas da família *Cucurbitaceae* apresentaram praticamente os mesmos sintomas, sendo estes, mosaico, clorose e bolhosidade, porém os sintomas mais agressivos foram observados nas plantas de *Cucurbita pepo* cv. ‘Caserta’ (Abóbora), como mosaico, afilamento e atrofiamento foliar, bolhosidade, deformação e diminuição do tamanho da planta (Figura 3).

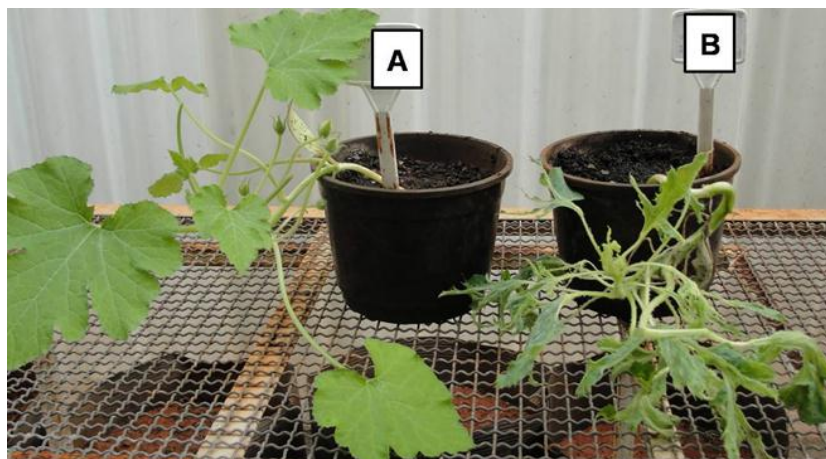


Figura 3. Sintomas em *Cucurbita pepo* cv. 'Caserta' (Abóbora). A: planta sadia; B: planta inoculada.

### 3.2. Detecção e identificação do isolado viral, por meio do teste sorológico DAS-ELISA

O isolado viral reagiu positivamente com o antissoro para o CMV e, especificamente, com o antissoro para o subgrupo I (Figura 4).

Das 16 amostras testadas, seis apresentaram valores de absorvância duas vezes superior ao controle negativo (planta sadia), indicando assim, que 37% das amostras de bananeira estavam infectadas com o CMV (Figura 4). As plantas da variedade Jangada, das amostras 1, 2, 3, 7 e 15, foram as que apresentaram os maiores valores de absorvância, além de apresentarem sintomas de estrias foliares amarelas e cloróticas, confirmando a presença do CMV do subgrupo I pelo método de detecção sorológica.

Em dez amostras de bananeira, os valores de absorvância se apresentaram abaixo dos valores obtidos no controle negativo, caracterizando como sadias para o CMV, ou seja, 63% das amostras, incluindo a variedade Maçã.

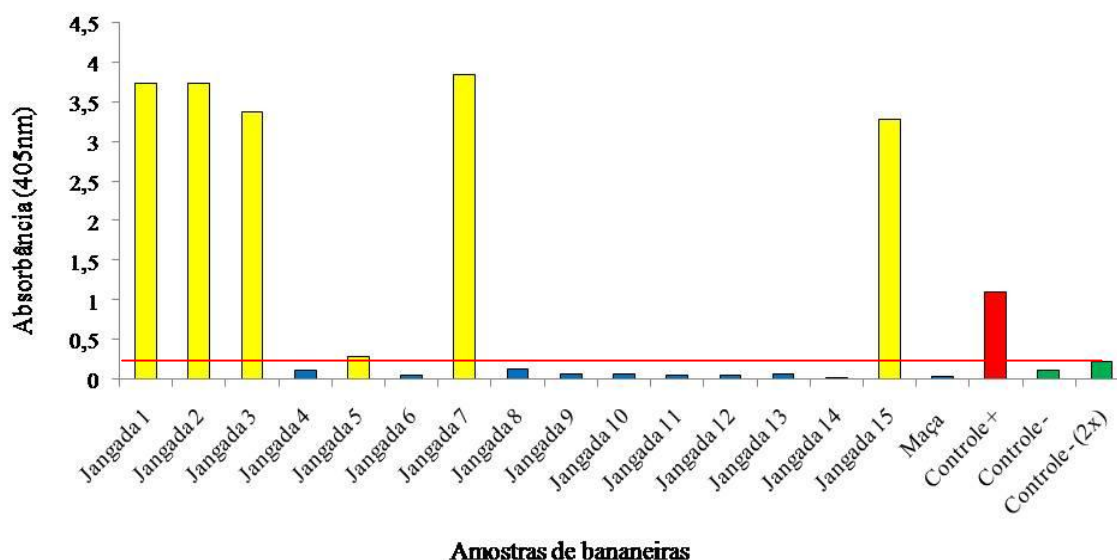


Figura 4. Valores de absorbância das leituras dos ensaios DAS-ELISA em bananeiras com o antissoro para o CMV (Agdia<sup>®</sup>), na diluição de 1/200. Amostras de bananeiras das variedades Jangada, Maça; controle (+) bananeira infectada com CMV; controle (-) bananeira sadia; controle (-) bananeira sadia multiplicado por 2.

### 3.3. Identificação molecular do isolado viral

#### 3.3.1. Extração do RNA total de plantas de bananeiras

O primeiro método de extração do RNA total de folhas de bananeira foi com o reagente Trizol<sup>®</sup> (Life Technologies<sup>®</sup>). Neste método, o “pellet” formado no final da extração apresentou uma coloração escura, característica da presença de compostos fenólicos, os quais interferem na qualidade do RNA obtido nas extrações.

No segundo método de extração, agora combinando o reagente Trizol<sup>®</sup> com o tampão CTAB (brometo de cetiltrimetilamônio), conforme descrito por James et al. (2011), contendo em sua composição o antioxidante PVP (polivinilpirrolidona), o qual evita o efeito oxidativo dos polifenóis, resultou na obtenção de um “pellet” de coloração esbranquiçada, indicativo da ausência de compostos oxidativos na amostra (ROMANO; MIRANDA, 1999).

Os RNAs totais extraídos nos dois protocolos foram quantificados, utilizando-se o Fluorômetro Qubit<sup>®</sup> 2.0, e foram obtidos os valores médios de 28,38 ng/μL para a metodologia com o reagente Trizol<sup>®</sup> e de 73,7 ng/μL para o RNA extraído utilizando a metodologia do reagente Trizol<sup>®</sup> combinado com o tampão CTAB.



Com base nos resultados obtidos, pode-se concluir que o protocolo utilizando a combinação do reagente Trizol<sup>®</sup> com o tampão CTAB foi o que resultou em maior quantidade de RNA total.

### 3.3.2. Reação de transcrição reversa e de polimerização em cadeia da polimerase (RT-PCR)

Foram obtidas ampliações de um fragmento genômico viral de aproximadamente 500 pb (Figuras 5 e 6), que conforme Wylie et al. (1993), corresponde à amplificação de 2/3 do gene codificador da capa protéica do CMV e à região não traduzível 3', confirmando a presença do vírus nas plantas testadas.

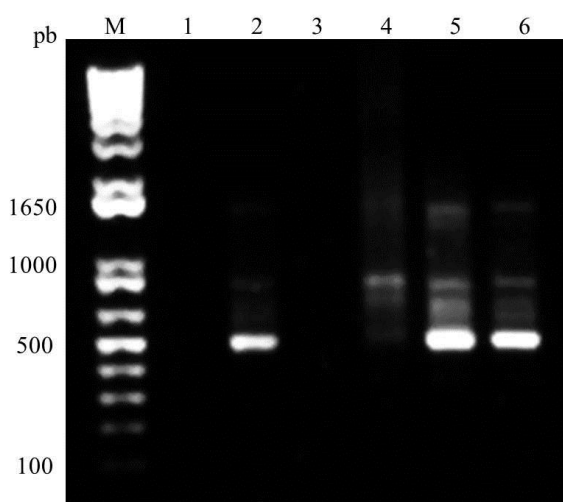


Figura 5. Amplificações por RT-PCR de fragmentos de DNA com aproximadamente 500 pb, com oligonucleotídeos para o CMV. M: Marcador molecular – 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen<sup>®</sup>); 1: amostra sem DNA; 2: Abóbora 'Caserta' inoculada com CMV; 3: Abóbora 'Caserta' sadia; 4: bananeira 'Grand Naine'(1); 5: bananeira 'Grand Naine' (2); 6: bananeira 'Maçã'.

Em quatro amostras de bananeira micropropagadas *in vitro*, três apresentaram bandas referentes à presença do vírus (Figuras 5 e 6). Para a amostra da variedade Maçã, foi confirmado o resultado positivo, obtido pelo teste DAS-ELISA, enquanto que, em duas amostras da variedade Grande Naine, negativas para o teste DAS-ELISA, se mostraram positiva no RT-PCR e apenas uma variedade Grand Naine se apresentou livre do CMV.

A amostra de bananeira Jangada 6, mesmo não apresentando sintomas do vírus e sendo negativa no teste DAS-ELISA, se mostrou positiva no RT-PCR (Figura 6). Para as amostras 1 e 2, da variedade Jangada, a confirmação da presença do CMV foi confirmada pelos sintomas visuais, pelo teste DAS-ELISA e pelo teste RT-PCR. Segundo Vunsh et al. (1990), a técnica da PCR é uma ferramenta diagnóstica altamente sensível, mostrando-se superior para determinados vírus de plantas sobre os métodos sorológicos comumente utilizados.

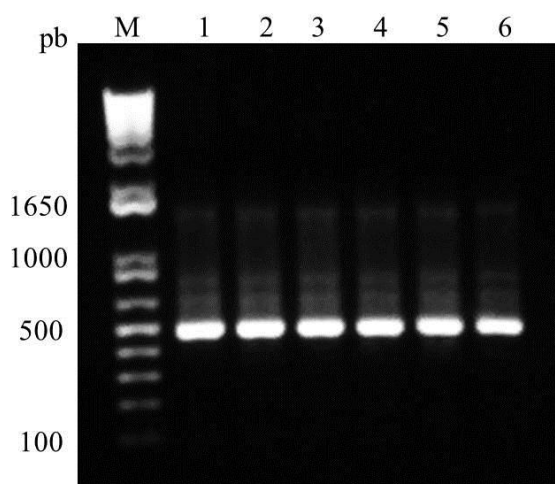


Figura 6. Amplificações por RT-PCR de fragmentos de DNA com aproximadamente 500 pb, com oligonucleotídeos para o CMV. M: Marcador molecular – 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen®); 1: Abóbora ‘Caserta’ inoculada com CMV; 2, 3, 4 e 5: bananeiras ‘Jangada’ amostras J1, J2, J6 e J7; 6: bananeira ‘Grand Naine’ micropropagada *in vitro*.

### 3.4. Sequenciamento do produto de amplificação por RT-PCR

As sequências de nucleotídeos obtidas de 459 pb foram analisadas e comparadas com as sequências depositadas no GenBank, utilizando a função Blast. Foram encontradas similaridades de 94 a 96%, com as sequências de sete isolados de CMV de bananeira, sendo cinco isolados do Brasil, dentre os quais, dois são de São Paulo, um do Espírito Santo, um de Minas Gerais e um de Pernambuco. Também foi encontrada uma similaridade com isolados de CMV de bananeira da Colômbia e de Camarões (Tabela 3).

A sequência obtida foi utilizada na construção de uma árvore filogenética, com auxílio do programa Mega 5.1, utilizando o método de “*Neighbor-Joining*”, com *bootstrap* de 1.000 repetições. Foram utilizadas sequências de nucleotídeos, que correspondem a região

que codifica a capa protéica do CMV, pertencentes aos subgrupos IA, IB e II, do GenBank (Tabela 4).

Tabela 3. Porcentagem de identidade da sequência de 459 pb do CMV de bananeira ‘Maçã’, obtida neste trabalho, com sequências do CMV depositadas no GenBank.

Espécies	Nº de acesso GenBank	% de Identidade
<i>Cucumber mosaic virus</i> - Ban-CM-Camarões	EU428827	96
<i>Cucumber mosaic virus</i> - Bass4-ES-BR	AY153423	96
<i>Cucumber mosaic virus</i> - Ban-PE-BR	AF547218	95
<i>Cucumber mosaic virus</i> - Ban-SP-BR	AY049748	95
<i>Cucumber mosaic virus</i> - Ban-Colômbia	U32859	95
<i>Cucumber mosaic virus</i> - Ban-SP-BR	AF547219	95
<i>Cucumber mosaic virus</i> - Ban-MG-BR	AY153425	94

Tabela 4. Sequências do CMV (gene da capa protéica) depositadas no GenBank, utilizadas no alinhamento com a sequência do CMV de bananeira ‘Maçã’ para a construção da árvore filogenética.

Espécies	Hospedeiras	Origem	Nº de acesso	Subgrupo
CMV-Ban-SP-BR	<i>Musa spp.</i>	Brasil – SP	AY049748	IA
CMV-Ban-SP-BR	<i>Musa spp.</i>	Brasil – SP	AF547219	IA
CMV-Ban-ES-BR	<i>Musa spp.</i>	Brasil – ES	AY153423	IA
CMV-Ban-PE-BR	<i>Musa spp.</i>	Brasil – PE	AF547218	IA
CMV-Ban-MG-BR	<i>Musa spp.</i>	Brasil – MG	AY153425	IA
CMV-Ban-CO	<i>Musa spp.</i>	Colombia	U32859	IA
CMV-Ban-CM	<i>Musa spp.</i>	Camarões	EU428827	IA
CMV- <i>Commelina</i> -PR	<i>Commelina sp.</i>	Brasil - PR	JQ894819	IA
CMV- <i>Catharanthus</i> -PR	<i>Catharanthus roseus</i>	Brasil – PR	JQ894820	IA
CMV- (C7-2) JP	-	Japão	D42079	IB
CMV- Phys- ÍN	<i>Physalis mínima</i>	Índia	X89652	IB
CMV- WL-EUA	<i>Nicotiana tabacum</i>	EUA	D00463.1	II
CMV-S-ZA	<i>Ornamental crops</i>	África do Sul	AJ131620	II

A árvore filogenética gerada (Figura 7) indicou que a sequência de nucleotídeos do CMV identificado neste trabalho agrupou-se no mesmo clado com outras sequências de CMV do subgrupo IA, confirmando resultados dos testes sorológicos de DAS-ELISA.

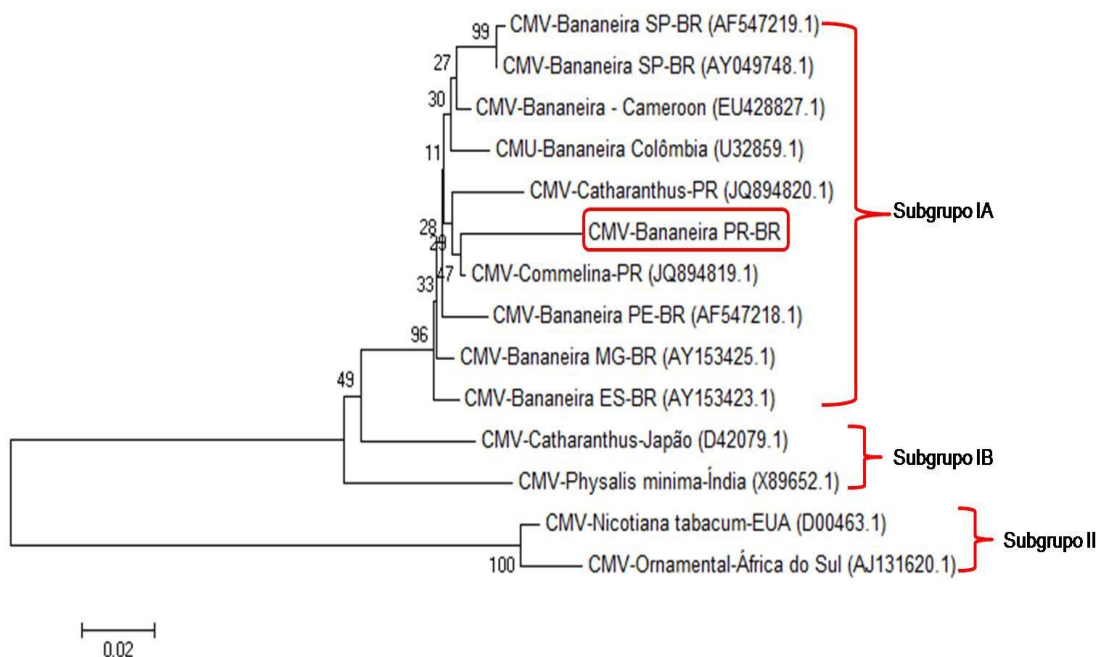


Figura 7. Árvore filogenética obtida a partir do alinhamento da seqüência do isolado de bananeira 'Maçã' (CMV-Bananeira PR-BR) com seqüências do CMV (subgrupos IA, IB e II) depositadas no GenBank. Os números sobre os ramos indicam a porcentagem de repetições obtidas nas análises de *bootstrap* (1.000 repetições).

#### **4. CONCLUSÕES**

O CMV está presente nas bananeiras das áreas de produção do norte do Paraná, sendo que o isolado seqüenciado foi identificado como do subgrupo IA, que prevalece no Brasil.

## 5. REFERÊNCIAS

- DANIELS, J.; CAMPBELL, R. N. Characterization of *Cucumber mosaic virus* isolates from California. **Plant Disease**, v. 76, p. 1245-1250, dez. 1992.
- EIRAS, M.; COLARICCIO, A.; CHAVES, A. L. R. Isolado do vírus do mosaico do pepino obtido de bananeira no Estado de São Paulo pertence ao subgrupo IA. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 26, n. 1, p. 53-59, 2001.
- FANCELLI, M.; MESQUITA, A. L. M. Pragas. In: CORDEIRO, Z. J. M. (Org.). **Banana: Fitossanidade**. Cruz das Almas: EMBRAPA-Mandioca e Fruticultura. – Brasília: EMBRAPA-Comunicação para Transferência de Tecnologia, v.1, p. 21-35, 2000.
- FIGUEIREDO, D. V.; BRIOSO, P. S. T. PCR multiplex para a detecção do BSV e do CMV em bananeiras micropropagadas. **Summa Phytopathologica**, Jaboticabal, v. 33, n. 3, p. 229-232, 2007.
- JAMES, A. P.; GEIJSKES, R. J.; DALE, J. L.; HARDING, R. M. Development of a novel rolling-circle amplification technique to detect *Banana streak virus* which also discriminates between integrated and episomal virus sequences. **Plant Disease**, v. 95, n. 1, p. 57-62, 2011.
- MEISSNER FILHO, P., BRIOSO, P. S. T. Doenças causadas por vírus. In: CORDEIRO, Z. J. M. (Org.). **Banana: Fitossanidade**. Cruz das Almas: EMBRAPA-Mandioca e Fruticultura. – Brasília: EMBRAPA-Comunicação para Transferência de Tecnologia, v.1, p. 78-82, 2000.
- PALUKAITIS, P.; ROOSSINCK, M. J.; DIETZGEN, R. G.; FRANCKI, R. I. B. *Cucumber mosaic virus*. **Advances in Virus Research**, v. 41, p. 281-348, 1992.
- ROMANO, E.; MIRANDA, A. C. B. Extração de DNA de plantas: soluções para problemas comumente encontrados. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, v. 2, n. 9, p. 40-43, 1999.
- SILBERSCHMIDT, K.; NÓBREGA, N. R. Sobre uma doença de vírus da bananeira. **O Biológico**, v. 7, p. 216-219, 1941.
- SILVEIRA, D. G.; MEISSNER FILHO, P. E.; SOARES, T. M. Indexação de germoplasma de bananeiras para o vírus do mosaico do pepino. **Magistra**, Cruz das Almas-BA, v. 16, n. 1, p. 42-46, 2004.
- VUNSH, R.; ROSNER, A.; STAIN, A. The use of polymerase chain reaction (PCR) for the detection of *Bean yellow mosaic virus* in *Gladiolus*. **Annals of Applied Biology**, v. 117, p. 561-569, 1990.
- WYLIE, S.; WILSON, C. R.; JONES, R. A. C.; JONES, M. G. K. A polymerase chain reaction assay for *Cucumber mosaic virus* in lupin seeds. **Australian Journal of Agriculture Research**, v. 44, n. 1, p. 41-51, 1993.

## CAPÍTULO 4

Detecção e caracterização molecular parcial do *Banana streak virus* isolado de bananeiras cultivadas no norte do Paraná.

## Detecção e caracterização molecular parcial do *Banana streak virus* isolado de bananeiras cultivadas no norte do Paraná.

### RESUMO

Este trabalho teve como objetivo utilizar a sorologia DAS-ELISA e a PCR na avaliação de amostras foliares de bananeiras com sintomas no pseudocaule e nas folhas, indicativos de infecção por BSV. Para isso, foram testadas amostras foliares obtidas a partir das brotações de 16 rizomas provenientes da região de Andirá-PR. O BSV foi detectado em todas as amostras analisadas, utilizando a técnica de PCR, com os *primers* Badna FP - Badna RP e Harper's 1A-4'. Porém, por meio do teste DAS-ELISA, apenas dez amostras se apresentaram infectadas com o BSV, possivelmente em infecção episomal, sendo nove da variedade 'Jangada' e uma da variedade 'Maçã'. Considerando a capacidade do BSV em integrar-se no genoma da bananeira, sendo passível de detecção por PCR, mesmo em plantas sadias, foi testado então o protocolo de amplificação por círculo rolante (RCA) para detecção de possíveis formas episomais do BSV efetivamente associadas à doença. Assim, o BSV episomal foi detectado em apenas cinco amostras. Também por RCA, em sete amostras obtidas por micropropagação, o BSV episomal foi detectado em apenas uma. Estes resultados foram também confirmados através do DAS-ELISA. Parte de um fragmento genômico de aproximadamente 7,5 Kpb do BSV, obtido após o tratamento do produto de RCA com a enzima de restrição *Xba*I, assim como, um produto de 600 pb obtido em amplificações de PCR com os *primers* Harper's 1A-4' foram sequenciados e comparados com sequências depositadas no GenBank. A análise filogenética realizada indicou o agrupamento do BSV-Bananeira-PR-BR com a espécie *Banana streak Obino l'Ewai virus* (BSOLV), com até 99% de similaridade com isolados dessa espécie, confirmando a presença da espécie BSOLV no Paraná.

**Palavras chaves:** BSV. *Badnavirus*. DAS-ELISA. PCR. RCA.



## Detection and partial molecular characterization of *Banana streak virus* isolated from cultivated bananas in northern Paraná

### ABSTRACT

The objective of this work was test DAS-ELISA serology and PCR in the evaluation of banana leaves and pseudostem samples with symptoms indicative of BSV Infection in leaves obtained from 16 rhizome shoots collected in Andirá-PR. BSV was detected in all analyzed samples, by the PCR technique with Badna FP-Badna RP and Harper's 1A-4' primers. However, by the DAS-ELISA test, only ten samples showed to be infected by BSV, possibly with an episomal infection, where nine of them were from 'Jangada' variety and one from 'Maça' variety. Considering the ability of BSV to integrate into the genome of banana plants, being susceptible to detection by PCR, even in healthy plants, the rolling circle amplification (RCA) protocol was tested for detection of BSV episomal forms effectively associated with the disease. Thus, episomal BSV was now detected in only five samples. In addition to that, in seven plants obtained by micropropagation and tested by RCA, the episomal BSV was detected only in two of them. These results were also confirmed by DAS-ELISA. Part of a genomic fragment of approximately 7,5 kb obtained after treatment of the RCA product with *Xba*I restriction enzyme and 600 pb amplified with Harper's 1A-4' primers in PCR reactions were sequenced and compared to sequences deposited in GenBank. Phylogenetic analysis indicated the grouping of BSV-Banana-PR-BR with the species *Obino l'Ewai Banana streak virus* (BSOLV), with up to 99% similarity, confirming the presence of this BSV species in Paraná state.

**Key words:** BSV. *Badnavirus*. DAS-ELISA. PCR. RCA.

## 1. INTRODUÇÃO

O *Banana streak virus* (BSV) causa a doença denominada por estrias da bananeira, que, até recentemente, não era considerada uma séria ameaça à cultura. Porém, nos últimos 15 anos, numerosos surtos espontâneos da doença foram encontrados em várias áreas produtoras de bananas. A origem destes surtos foram correlacionadas com a presença de pararetrovírus endógenos de planta (EPRVs) no genoma de cultivares, fenômeno este que tem contribuído para a distribuição generalizada de BSV dentro de áreas de produção de banana (LOCKHART; JONES, 2000).

O BSV pertence ao gênero *Badnavirus* e à família *Caulimoviridae* é um vírus de DNA circular de fita dupla fechado. Possui partículas baciliforme não envelopadas de tamanho  $30 \times 130 \pm 150$  nm, com genoma com tamanho aproximado de  $7,4 \pm 8,0$  kpb, (GAYRAL et al., 2008).

Perdas variáveis em bananais são atribuídas à infecção pelo BSV, podendo atingir até 90% da produção. Essa grande porcentagem ocorre devido ao vírus ficar integrado no genoma da planta hospedeira, uma vez que não existem métodos que permitam deixar a planta livre do BSV após a mesma ter sido infectada. Assim, essas plantas infectadas não podem ser utilizadas em cruzamentos, pois transmitirão o vírus para a sua progênie (MEISSNER FILHO; BRIOSO, 2000). Segundo James et al. (2011), perdas de 6-15% no rendimento têm sido associadas com a doença causada pelo *Banana streak virus* e as infecções são influenciadas pela cultivar, espécies de vírus, e pelas condições ambientais.

Este vírus é considerado, geralmente, como o fator mais importante que limita o intercâmbio internacional de germoplasma da bananeira para o melhoramento genético. Isto ocorre devido à falta de testes diagnósticos confiáveis e precisos que tenham a capacidade de detectar a extensa gama de variabilidade genômica e sorológica conhecida dentro dos isolados do BSV. Este problema é agravado pela presença de sequências integradas do BSV, das quais os BSVs endógenos ativáveis (eaBSVs) podem ser ativados, por exemplo, por meio da cultura de tecidos, e causar a doença e também a geração de falsos positivos nas reações de PCR decorrentes dessas sequências integradas (JAMES et al., 2011).

Yang et al. (2003) relatam que a presença das sequências integradas complica ainda mais o desenvolvimento de diagnósticos virais, devido à necessidade de diferenciar, entre sequências virais integradas no genoma da bananeira da infecção episomal do BSV.

Um elevado grau de heterogeneidade genômica e sorológica entre os isolados de BSV representa um desafio para uma indexação confiável do vírus. Além disso, a integração do genoma do vírus no genoma do hospedeiro tem sido detectada em praticamente todos os tecidos de *Musa* spp., com testes positivos para BSV (HARPER et al., 2002).

Segundo James et al. (2011), ao contrário da técnica de PCR, a técnica de RCA (Amplificação por círculo-rolante) amplifica especificamente o genoma circular do BSV, detectando o BSV em infecção episomal, ou seja, detectando os virions que poderiam ocasionar sintomas da doença e não sequências do vírus integradas no genoma da bananeira. Estes mesmos autores detectaram, por meio desta mesma técnica, a presença de BSOLV na Austrália e Uganda, bem como BSUgIV, BSUgLV, BSUgMV, BSGFV em Uganda, sendo este o primeiro relato confirmando derivados episomais de BSUgIV, BSUgLV e BSUgMV naquele país (JAMES et al., 2011). A utilização de RCA como um método para a detecção de isolados de BSV infectando bananeira demonstra a capacidade deste método para diferenciar entre sequências genômicas virais episomais e integradas.

O objetivo do presente trabalho foi detectar o BSV em bananeiras por meio do teste sorológico DAS-ELISA e por meio dos testes moleculares, como a reação de PCR, além de testar a técnica de RCA (Amplificação por círculo-rolante), visando amplificar especificamente o genoma episomal circular do BSV e comparar os métodos de detecção. E finalmente, realizar a caracterização molecular parcial da espécie de BSV identificada.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

Para a detecção do *Banana streak virus* (BSV), foram coletadas folhas e rizomas de bananeiras das variedades Jangada, Maçã e Prata Anã, obtidas de áreas de produção da região de Andirá no Norte do Paraná. Também foram indexadas para o BSV mudas de bananeiras micropropagadas *in vitro* das variedades Grand Naine, Nanicão comum, IAC 2001 e Jangada.

Dentre as amostras coletadas, algumas amostras foliares de bananeiras da variedade Jangada apresentavam sintomas de estrias cloróticas ao longo da lâmina foliar, provavelmente associados à infecção por BSV (Figura 1).



Figura 1. Sintomas de estrias cloróticas ao longo da lâmina foliar provavelmente associados à infecção por BSV em bananeiras da variedade Jangada provenientes de Andirá-PR.

### 2.1. Detecção sorológica do BSV por DAS-ELISA

A detecção do BSV foi realizada em 16 amostras de bananeiras, sendo 15 da variedade Jangada e uma da variedade Maçã, por meio do teste sorológico DAS-ELISA (*Double-antibody sandwich*), conforme as recomendações feitas pelo fabricante (Agdia®). Foi utilizado anticorpo policlonal comercial da Agdia® para o SCBV (relacionado sorologicamente com o BSV) e o protocolo utilizado foi o mesmo descrito no capítulo 2 (item: 2.2. Indexação das plantas micropropagadas).

## **2.2. Detecção molecular do BSV**

### **2.2.1. Extração do DNA total de plantas de bananeiras**

A extração do DNA total das plantas de bananeiras foi realizada utilizando o detergente catiônico CTAB (brometo de cetil-trimetilamônio), conforme descrito por James et al. (2011). Folhas de bananeiras frescas (0,4 g) foram maceradas em nitrogênio líquido, com posterior adição de 3 mL de tampão de extração CTAB [100 mM Tris-HCl pH 8,0, 50 mM EDTA (ácido etileno diamono tetracético), 1,4 M NaCl, 80 mM Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>, 2% PVP-10 (polivinilpirolidone) e 2% CTAB (brometo de cetiltrimetilamônio)] e transferidas para tubos plásticos tipo eppendorf de 1,5 mL. As amostras foram incubadas a 65° C por 15 min e centrifugadas por 5 min a 12.000 rpm. O sobrenadante formado foi misturado com igual volume de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1) e a mistura centrifugada a 12.000 rpm por 5 min para separar a fase orgânica da aquosa. A fase aquosa foi transferida para um novo tubo e uma segunda extração com clorofórmio: álcool isoamílico (24:1) foi realizada. O sobrenadante formado foi misturado com igual volume de isopropanol e incubado em temperatura ambiente por 5 min, com posterior centrifugação a 12.000 rpm por 10 min. Descartou-se o sobrenadante e o “pellet” formado foi lavado com etanol 70%, com centrifugação a 7.500 rpm por 10 min. O sobrenadante foi descartado e o “pellet” seco ao ar, invertendo o tubo em papel-toalha estéril por 10 min. O “pellet” foi ressuspensão em 50 µL de água DEPC e incubado a 37°C por 30 min. As amostras foram armazenadas a 4°C até o uso.

### **2.2.2. Reações de PCR**

Nas reações de PCR, foram testados três pares de *primers* que codificam a transcriptase reversa (RT) e a RNase H dos *Badnavirus*, sendo estes: Badna FP-Badna RP (YANG, 2003); Harper's 1A-4' (HARPER; HULL, 1998); e 5345F e 6681R, o qual, segundo Delanoy et al. (2003), amplificam o BSV apenas em infecção episomal.

Foram testadas 16 amostras de bananeiras, sendo 14 da variedade Jangada, uma da variedade Maçã e uma da variedade Prata Anã, sendo todas obtidas de um produtor do município de Andirá-PR.

### - Primeiro par de *primers* Badna FP e Badna RP

O primeiro par de *primers* utilizado, o Badna FP (5' ATG CCI TTY GGI AAR AAY GCI CC 3') e o Badna RP (5' CCA YTT RCA IAC ISC ICC CCA ICC 3'), é baseado nas sequências consenso das regiões que codificam a RT e a RNaseH das sequências dos *Badnavirus*, o que resultou na amplificação de um produto de 580 pb (YANG et al., 2003).

A reação de PCR foi realizada utilizando 1 µL do DNA total, 2,5 µL de tampão 10 X PCR *Buffer* (200 mM Tris-HCl, 0.1 mM EDTA, 1 mM DTT, 50% (v/v) glicerol), 1 µL de cada *primer* a 10 mM, 0,2 µL de mix de dNTPs (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) a 10 mM, 1 µL de cloreto de magnésio (MgCl<sub>2</sub>) a 50 mM, 0,5 µL de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen®) a 2.5 U/ µL, com volume final de reação de 20 µL. As amplificações foram realizadas em termociclador (Techne; modelo TC- 512), com desnaturação inicial de 94°C por 4 min, seguido por 40 ciclos de 94°C durante 30 seg (desnaturação), 50°C durante 30 seg (anelamento), 72°C durante 30 seg (extensão), e uma extensão final de 72°C durante 5 min, segundo o protocolo proposto por Yang et al. (2003).

### - Segundo par de *primers* Harper's 1A-4'

O par de *primers* 1 A *Forward* (5' CTN TAY GAR TGG YTN GTN CCN TTY GG 3') e *primer* 4' *Reverse* (5' TCC AYT TRC ANA YNS CNC CCC ANC 3'), que também é baseado nas sequências consenso das regiões que codificam RT e RNaseH de sequências do *Badnavirus*, amplifica um produto de 600 pb (HARPER; HULL, 1998).

A reação de PCR foi realizada utilizando 2 µL do DNA total, 5 µL de tampão 10X PCR *Buffer* (200 mM Tris-HCl, 0.1 mM EDTA, 1 mM DTT, 50% (v/v) glicerol), 5 µL de cada *primer* a 10 mM, 1 µL de mix de dNTPs (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) à 10 mM, 1,5 µL de cloreto de magnésio (MgCl<sub>2</sub>) a 50 mM, 0,5 µL de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen®) a 2.5 U/µL, com volume final de reação de 50 µL. As amplificações foram realizadas em termociclador (Techne; modelo TC- 512), com desnaturação inicial de 94°C por 5 min, seguido por 5 ciclos de 94°C durante 30 seg, 37°C durante 30 seg, 72°C durante 1 min e 30 seg, e uma nova etapa com 30 ciclos de 94°C durante 30 seg, 50°C durante 30 seg, 72°C durante 1 min e uma extensão final de 72°C durante 10 min, segundo o protocolo proposto por Harper e Hull (1998).

### - Terceiro par de *Primers* 5345F e 6681R

O par de *primers* 5345 *Forward* (5' TTG GTG TTT AAC TAT AA 3') e 6681 *Reverse* (5' TTA TTG CAT CCA CAT T 3') deve apenas amplificar o BSV episomal, o qual foi desenhado a partir das sequências mais conservadas de diferentes estirpes de BSV, amplificando uma região de aproximadamente 1.300 pb da sequência consenso da transcriptase reversa RT e da RNaseH (DELANOY et al., 2003).

Para a reação de PCR, foram utilizados 2 µL de ácido nucléico total, 1,6 µL de cada *primer*, 0,4 mM de mix de dNTPs (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) a 10 mM, 0,8 µL de cloreto de magnésio (MgCl<sub>2</sub>) a 50 mM, 2,0 µL de tampão de reação 10x PCR Buffer, e 0,3 µL de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen®) a 2.5 U/µL, com volume final de reação de 20 µL. As ampliações foram realizadas em termociclador (Techne; modelo TC- 512), com desnaturação inicial de 94°C por 5 min, seguido por 40 ciclos de 95°C durante 30 seg (desnaturação), 53°C durante 20 seg (anelamento), 72°C durante 60 seg (extensão), e uma extensão final de 72°C durante 5 min.

### - Eletroforese em gel de agarose dos produtos da PCR

Os produtos de PCR obtidos com os diferentes *primers* foram aplicados em um mini gel de agarose a 1,2%, preparado em tampão TAE 1X (Tris 0,04 M, acetato de sódio 0,02 M e ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) 0,0001 M, pH 8,3) e corado com 0,25 x SYBR® *Safe DNA Gel Stain* (Invitrogen®). Após a corrida de eletroforese horizontal durante 45 min a 85 V, os fragmentos obtidos no gel foram visualizados sob luz ultravioleta em fotodocumentador e, para avaliar o tamanho dos fragmentos amplificados, foram utilizados os marcadores moleculares da Invitrogen® de 100 pb e de 1 Kb (*Plus DNA Ladder*) e o marcador da Promega® de 1 Kb *DNA Ladder* como padrão.

### 2.2.3. Amplificação por círculo rolante (RCA) do genoma do BSV

Para se confirmar a infecção episomal do BSV, foi utilizado o Kit de amplificação por círculo rolante (RCA) *TempliPhi Amplification Kit* (Amersham Biosciences) (GE Healthcare®), de acordo com as instruções do fabricante.

Para a reação de RCA, foram testados em conjunto e separadamente os mesmos *primers* degenerados descritos anteriormente, o Badna FP-RP e o Harper's 1A-4', utilizados por James et al. (2011) e Wambulwa et al. (2012), para a detecção do BSV por RCA.

*Primers* hexâmeros randômicos, existentes no kit, anelam no DNA molde circular em vários locais. A DNA polimerase  $\phi$  29 estende a partir de cada um destes *primers*. Quando a DNA polimerase atinge o *primer* "downstream" ocorre a síntese da fita e esta é processada em uma fita simples disponível para anelar os *primers* (Figura 2).

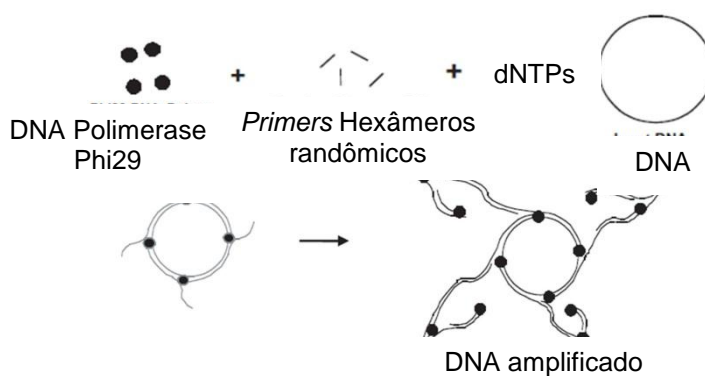


Figura 2. Modelo esquemático da amplificação por círculo rolante (RCA), conforme o protocolo do kit *TempliPhi Amplification* (Amersham Biosciences) (GE Healthcare®).

A reação de RCA foi iniciada com a adição em um microtubo de 0,2 mL, de 1  $\mu$ L de DNA, 5  $\mu$ L do tampão de amostra e 1  $\mu$ L de cada *primer* (Badna FP-RP e Harper's 1A-4') a 50  $\mu$ M. A mistura foi desnaturada a 95°C por 3 min e resfriada em gelo. Posteriormente, foram adicionados 5  $\mu$ L de tampão de reação pré-misturado com 0,2  $\mu$ L do mix da enzima e incubados a 30°C por 18 horas, posteriormente a reação foi paralizada por incubação a 65°C por 10 min.

O DNA produzido por meio da amplificação por círculo rolante (RCA) foi digerido usando três unidades da enzima de restrição *KpnI*, seguindo o protocolo descrito pelo fabricante. Para isso, adicionou-se em um microtubo de 0,2 mL, 10  $\mu$ L do produto de RCA, 0,5  $\mu$ L da enzima de restrição (10 U/ $\mu$ L), 2  $\mu$ L do seu tampão específico da enzima (RE 10X Buffer), acrescido de água DEPC para completar o volume final de 20  $\mu$ L. As amostras foram incubadas a 37°C por 4 horas e, posteriormente, os produtos da digestão foram analisados em



gel de agarose a 1,2 %, preparado com o tampão de corrida TAE 1X, 0,25 x SYBR<sup>®</sup> *Safe DNA Gel Stain* (Invitrogen<sup>®</sup>), conforme as especificações descritas anteriormente.

### 2.3. Clonagem de um dos produtos de RCA obtido após reações de restrição enzimática

Os produtos de RCA foram digeridos com as enzimas de restrição *KpnI*, *BamHI*, *EcoRI* e *XbaI*, conforme o protocolo de cada enzima. Posteriormente, um fragmento de aproximadamente 1,2 kpb obtido na reação de *XbaI* foi utilizado para clonagem no plasmídeo pUC19 (Invitrogen<sup>®</sup>), previamente clivado com esta mesma enzima. Para a reação de ligação foram utilizados, 5 µL de 2 x *Rapid Ligation Buffer*, 4 µL do produto de RCA, 5 µL do plasmídeo pUC 19 (0,25 µg/µl) e 1 µL de T4 DNA Ligase 3 U/ µL (Promega<sup>®</sup>). As reações de ligação foram incubadas a 4 °C por 24 horas.

A transformação foi realizada por meio do choque térmico, utilizando bactérias competentes *Escherichia coli* da linhagem DH5α. Para isso, estas foram descongeladas em gelo por 10 min e 50 µL transferidos para um micro tubo com adição de 2 µL da reação de ligação, mantendo-se os tubos de reação no gelo por 30 min. O choque térmico foi realizado incubando o tubo por 2 min a 42° C e depois em gelo por mais 2 min. Posteriormente, adicionou-se 450 µl de meio SEC [1 mL de meio LB líquido (6,25 g de *Luria Broth Base*; 250 mL de água destilada); 10 µL de MgCl<sub>2</sub> 1M; 10 µL de MgSO<sub>4</sub> 1 M; 20 µL de glicose 1 M] e a mistura foi mantida em agitação a 37°C por 1 hora para reestruturação das células competentes.

O meio de seleção para o crescimento das bactérias foi preparado com adição de 20 mL de meio sólido LB [6,25 g de *Luria Broth Base*; (3,75 g de ágar; 250 ml de água destilada), 40 µL de X-gal (20 mg/mL), 200 µL de ampicilina (5 mg/mL) e 7 µL de IPTG (200 mg/mL)] e vertido em placa de Petri. Após solidificação do meio, aplicou-se 50 µL da cultura de células transformadas, espalhando-as com o auxílio de uma alça de Drigalski. As placas foram incubadas em estufa a 37° C, por 16 horas.

As colônias foram selecionadas pela sua coloração, assim, os clones que apresentaram coloração branca (indicativo da presença do inserto no plasmídeo) foram coletados com o auxílio de palitos de madeira esterilizados e transferidos para tubos falcon esterilizado, contendo 5 mL de meio LB líquido e 50 µL de ampicilina (5 mg/mL). Os tubos foram mantidos a 37°C por 16 horas sob agitação para a multiplicação das células. Para estoque dos clones positivos, ou seja, das colônias brancas, foram adicionados em microtubos

150 µL de glicerol e 850 µL da cultura e estocados em freezer -80°C. O restante da cultura foi utilizada para a extração do DNA plasmidial.

### 2.3.1. Extração do DNA plasmidial

A extração do DNA plasmidial das colônias de bactéria foi realizada utilizando o *Kit PureYield™ Plasmid Miniprep System* (Promega®), segundo as recomendações do fabricante. As colônias de bactérias foram concentradas por centrifugação a 4.000 rpm por 5 min, com posterior descarte do sobrenadante e ressuspensão do precipitado em 600 µL da solução descartada. Cada colônia foi transferida para um microtubo de 1,5 mL; e em seguida, adicionou-se 100 µL de *Cell Lysis Buffer* e misturou-se invertendo o tubo por seis vezes (a solução passou de opaca para azul claro, indicando a completa lise). Em seguida, foi adicionado ao tubo 350 µL de *Neutralization Solution* (4°C), sendo a mistura homogeneizada invertendo o tubo por algumas vezes até que a mistura apresentasse coloração amarela, indicando a completa neutralização. Posteriormente, foi realizada uma centrifugação à 14.000 rpm por três min. O sobrenadante obtido foi transferido para uma microcoluna acoplada à um novo tubo, seguido de uma centrifugação à 14.000 rpm por 15 seg. O efluído foi descartado da microcoluna e adicionou-se 200 µL de *Endotoxin Removal Wash*, com uma nova centrifugação à 14.000 rpm por 15 seg, seguido da adição de 400 µL de *Column Wash solution*, com centrifugação à 14.000 rpm por 30 seg. A microcoluna foi transferida para um novo tubo de 1,5 mL e adicionado 30 µL de *Elution Buffer*, com posterior incubação em temperatura ambiente por 1 min, seguido de uma centrifugação à 14.000 rpm por 15 seg para eluir o DNA plasmidial e, em seguida, armazenados a -20°C.

Com o produto da extração do DNA plasmidial, uma nova reação de PCR foi realizada, utilizando-se os *primers* M13/pUC *Forward Amplification* e M13/pUC *Reverse Amplification* (Invitrogen®). Para a reação foram utilizados 2,0 µL do DNA, 1,0 µL de cada *primer* (10 µM), 0,4 µL de mix de dNTPs (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) a 10 mM, 0,6 µL de cloreto de magnésio (MgCl<sub>2</sub>) a 50 mM, 2,0 µL de tampão de reação 10x PCR Buffer, e 0,3 µL de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen®) a 2.5 U/µL, com volume final de reação de 20 µL. As amplificações foram de: desnaturação inicial de 94°C por 5 min, seguido por 40 ciclos de 94°C durante 50 seg, 63°C durante 1 min, 55 °C durante 50 seg e uma extensão final de 72°C durante 5 min.

Após amplificação por PCR, as amostras foram submetidas a uma eletroforese, em gel de agarose a 1,2%, utilizando como marcador o *Low DNA Mass Ladder* (Promega®) para identificação dos clones contendo insertos correspondentes aos fragmentos da RCA obtidos na reação de restrição após o tratamento com a enzima *XbaI*, conforme sugerido por James et al., (2011). Posteriormente, foi selecionado o clone contendo um inserto de aproximadamente 1,2 kbp, cujo DNA foi quantificado, antes de ser enviado para sequenciamento.

#### **2.4. Sequenciamento para identificação viral**

O clone contendo o fragmento de RCA de aproximadamente 1,2 Kpb, obtido na reação de restrição enzimática com *XbaI*, utilizando os *primers* M13/pUC *Forward Amplification* e M13/pUC *Reverse Amplification*, juntamente com um dos produtos de PCR amplificado com os *primers* Harper's 1A-4', que delimitam uma região de 600 pb da ORF III do BSV, foram enviados para o sequenciamento no Setor de Sequenciamento de DNA, no Centro de Estudos do Genoma Humano, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo – USP. Foram enviados microtubos de 0,2 mL, com 5 µL de cada DNA e 2,5 µL do respectivo *primer* (5 µM) *forward* e *reverse*.

Como método de comparação foram utilizadas sequências de nucleotídeos do BSV depositadas no GenBank ([www.ncbi.nlm.nih.gov/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/)). Essas foram alinhadas mediante a utilização do programa Clustal W ([www.ebi.ac.uk/Clustalw](http://www.ebi.ac.uk/Clustalw)). A árvore filogenética foi construída a partir dos alinhamentos utilizando o programa Mega 5.1 beta 2 ([www.megasoftware.net](http://www.megasoftware.net)). As filogenias para cada conjunto de dados foram construídas pelo método de “*Neighbor-Joining*”. Os ramos das árvores foram testados por *bootstrap*, com 1.000 repetições.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

#### 3.1. Detecção sorológica do BSV por DAS-ELISA.

Das 16 amostras de bananeiras testadas pelo teste DAS-ELISA, dez amostras apresentaram valores de absorbância duas vezes superiores ao controle negativo (planta sadia), indicando que as amostras estariam infectadas com o BSV episomal, das quais nove eram da variedade Jangada e uma da variedade Maçã, ou seja, 62% das amostras estariam infectadas com o vírus (Figura 3). Seis amostras apresentaram valores de absorbância abaixo dos obtidos no controle negativo, 38% das amostras testadas.

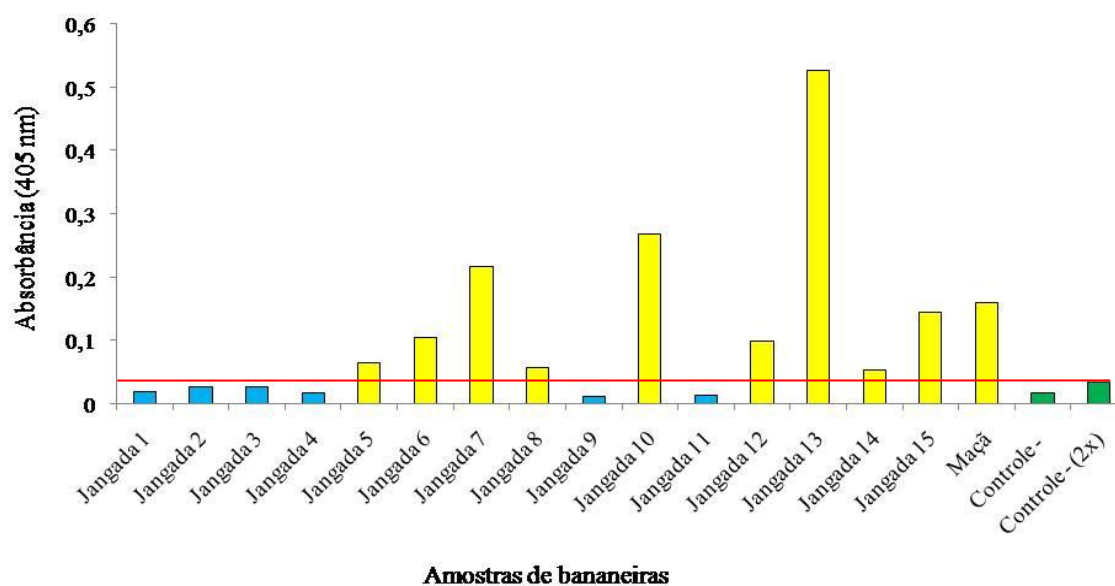


Figura 3. Valores de absorbância das leituras dos ensaios DAS-ELISA em bananeiras para o *Banana streak vírus* utilizando antissoro para o *Sugarcane bacilliform virus* (SCBV) da AGDIA<sup>®</sup>, na diluição de 1/200, em amostras de bananeiras das variedades Jangada, Maçã, controle (+) bananeira infectada com CMV; controle (-) bananeira sadia; controle (-) bananeira sadia multiplicado por 2; diluição das amostras em 1/10.

Segundo Almeida et al. (2001), o teste ELISA serve não apenas para identificar, mas também para quantificar vírus de plantas. Assim, por meio dos valores de absorbância obtidos, pode-se inferir que as plantas de bananeiras testadas estavam com diferentes

concentrações virais. Isso pode ser observado nas amostras de Jangada 5, 8 e 14, que apresentaram os menores valores de absorvância, ou seja, estariam com as mais baixas concentrações do vírus.

As amostras ‘Jangada’ 7, 10 e 13 apresentaram os maiores valores de absorvância e também apresentaram sintomas de estrias cloróticas ao longo da lâmina foliar ocasionados pela infecção por BSV, sendo a amostra 13 a de maior concentração viral.

É esperado que o DAS-ELISA detecte apenas formas episomais do BSV, uma vez que os antissoros são produzidos a partir de regiões antigênicas contidas no capsídeo viral, ao contrário da PCR, que pode detectar sequências de DNA viral episomal, assim como sequências integradas no genoma da bananeira.

### **3.1.1. Detecção simples e mista do CMV e BSV por meio do teste DAS-ELISA.**

Os resultados obtidos no teste DAS-ELISA para a detecção do CMV, apresentados no capítulo 3, foram comparados com os resultados obtidos para a detecção do BSV com o mesmo teste (Tabela 1).

Das 16 amostras testadas, seis apresentaram resultados positivos para o CMV, ou seja, 37% das amostras estavam infectadas com o vírus. Para o BSV, dez amostras foram positivas, sendo 63% de plantas infectadas com o BSV episomal. Do total de amostras, três estavam infectadas somente com o CMV, sete somente com BSV, três apresentaram resultados positivos para os dois vírus, o que representa 18% das bananeiras com infecção mista, e apenas três amostras estavam sadias.

Tabela 1. Detecção do BSV e CMV em plantas de bananeiras das variedades Jangada e Maçã através do teste sorológico DAS-ELISA.

Variedades de bananeiras	CMV	BSV	CMV e BSV
'Jangada' 1	+	-	-
'Jangada' 2	+	-	-
'Jangada' 3	+	-	-
'Jangada' 4	-	-	-
'Jangada' 5	+	+	+
'Jangada' 6	-	+	-
'Jangada' 7	+	+	+
'Jangada' 8	-	+	-
'Jangada' 9	-	-	-
'Jangada' 10	-	+	-
'Jangada' 11	-	-	-
'Jangada' 12	-	+	-
'Jangada' 13	-	+	-
'Jangada' 14	-	+	-
'Jangada' 15	+	+	+
'Maçã'	-	+	-

### 3.2. Detecção Molecular do BSV

#### 3.2.1. Reações de PCR

##### - Primeiro par de *primers* Badna FP e Badna RP

Das 16 amostras de bananeiras testadas, 14 da variedade Jangada, uma da variedade Maçã e uma da variedade Prata Anã, em todas houve amplificação, resultando em bandas do tamanho esperado, indicando a presença do BSV. Entretanto, com estes *primers*, houve amplificação de bandas inespecíficas (Figura 4).

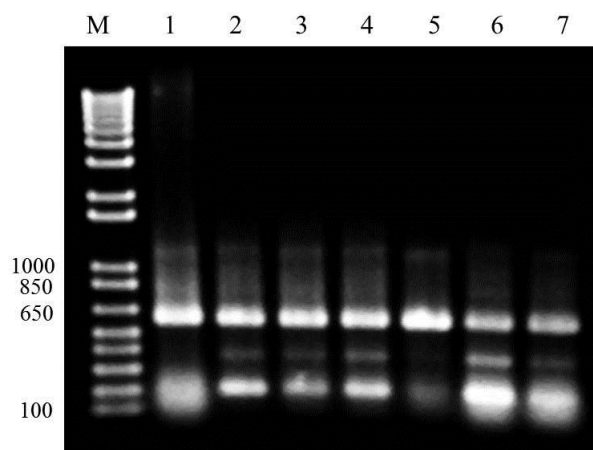


Figura 4. Fragmentos de DNA de aproximadamente 600 pb em amostras de bananeiras, utilizando o par de *primers* Badna FP e Badna RP para detecção do BSV. M: Marcador molecular – 1 Kb Plus DNA *Ladder* (Invitrogen®); 1 ao 7: amostras de bananeiras ‘Jangada’ do J1 a J7.

Também foram testadas cinco amostras de bananeiras micropropagadas *in vitro*, sendo uma da variedade IAC 2001, positiva para o BSV pelo teste DAS-ELISA, uma da variedade Nanicão comum, negativa para o BSV pelo teste DAS-ELISA, e três da variedade Grand Naine. Em todas as amostras, houve amplificações. Todavia, também neste caso, ocorreram amplificações inespecíficas, provavelmente relacionadas à amplificação de regiões genômicas endógenas da bananeira.

#### **- Segundo par de *primers* Harper’s 1A-4’**

Um segundo par de *primers* Harper’s 1A-4’ (HARPER et al., 2002) também foi testado. Neste caso, foram obtidas amplificações de bandas únicas, claras, distintas e do tamanho esperado, conforme sugerido por Harper et al. (2002), para a amplificação genômica do BSV (Figura 5).

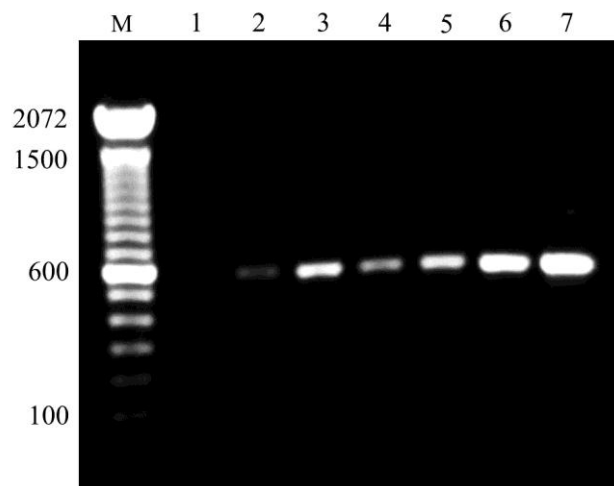


Figura 5. Fragmentos de DNA com aproximadamente 600 pb em amostras de bananeiras, utilizando o par de *primers* Harper's 1A-4' para detecção do BSV. M: Marcador molecular – 100 pb DNA *Ladder* (Invitrogen®); 1: Controle negativo, sem DNA; 2: 'Grand Naine' (1) (cultura de tecidos); 3: 'Grand Naine' (2) (cultura de tecidos); 4: 'Jangada' (cultura de tecidos); 5: 'IAC 2001' (cultura de tecidos); 6 e 7: 'Jangada', amostras J10 e J13.

A alta quantidade de plantas positivas para o BSV, indicado pela PCR, talvez esteja relacionado à amplificação tanto de formas endógenas como episomais do BSV, como também verificado anteriormente por James et al. (2011), sugerindo a ocorrência de falsos positivos. Harper et al. (1996), utilizando a PCR, também detectaram a presença generalizada de sequências do BSV em *Musa*.

Harper e Hull (1998) sugerem que todas as bananeiras híbridas estariam potencialmente infectadas com o BSV, devido à formação de um complexo BSV integrante denominado EPRV (*Endogenous Pararetrovirus Sequence*), estando presente no genoma B da bananeira (variedades Prata e Maçã) e podendo ser capaz de originar infecção episomal quando a planta é submetida à cultura de tecidos, com o aparecimento dos sintomas da doença na planta. Por outro lado, essas sequências integradas não levariam necessariamente ao desenvolvimento de doença (HARPER et al., 1999).

#### - Terceiro par de *Primers* 5345F e 6681R

Finalmente, foi testado o terceiro par de *primers* 5345F e 6681R, para os quais não se espera a amplificação de sequências virais integradas no genoma da bananeira (DELANOY et al., 2003).



Das 23 amostras de bananeiras testadas, 11 apresentaram bandas do tamanho esperado nas reações de PCR, sendo sete da variedade Jangada, duas da IAC 2001, uma da variedade ‘Prata Anã’ e uma da variedade ‘Maçã’ (Figuras 6A e 6B; Figuras 7A e 7B).

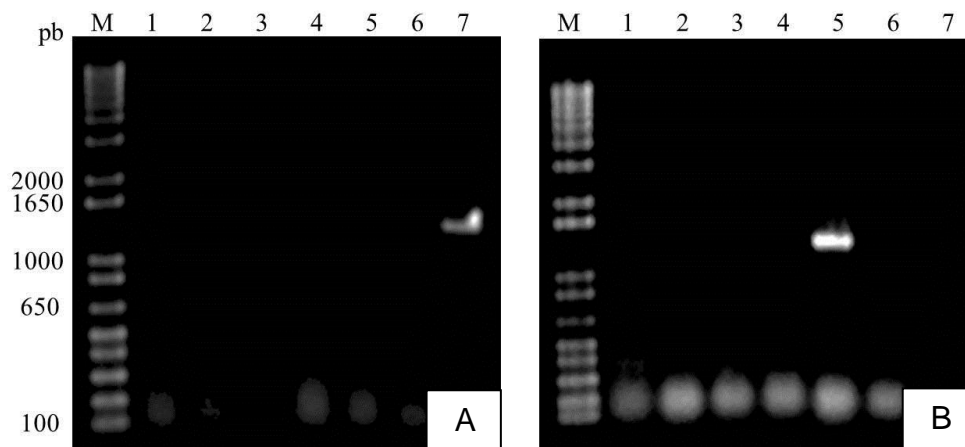


Figura 6. Fragmentos de DNA com aproximadamente 1.300 pb em amostras de bananeiras, utilizando o par de *primers* 5345F e 6681R para detecção do BSV. M: Marcador molecular – 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen®); A – 1 ao 4 e 7: ‘Jangada’, amostras J1, J4, J7, J11 e J10; 5: ‘Jangada’ (3) (cultura de tecidos); 6: ‘Grand Naine’ (Itajaí-SC). B – 1 ao 7: ‘Jangada’, amostras J2, J3, J5, J6, J7, J8 e J9.

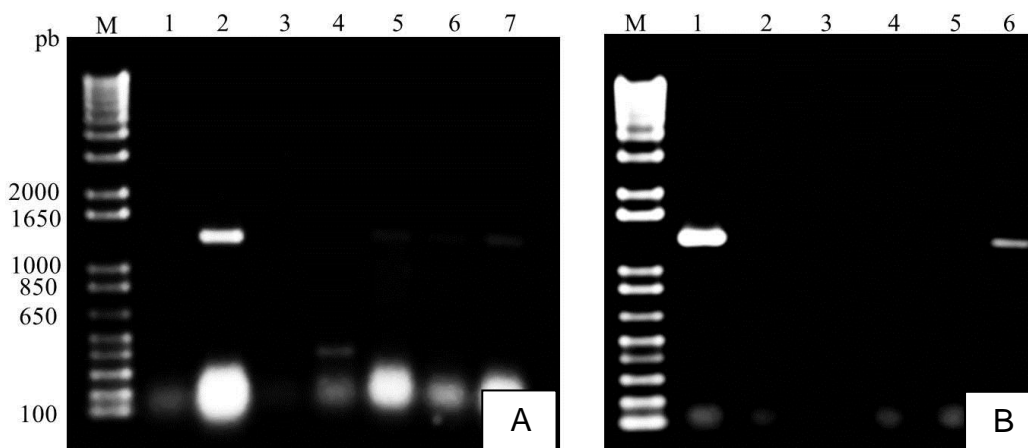


Figura 7. Fragmentos de DNA com aproximadamente 1.300 pb em amostras de bananeiras, utilizando o par de *primers* 5345F e 6681R para detecção do BSV. M: Marcador molecular – 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen®); A – 1: controle negativo, sem DNA; 2: ‘Jangada’ (J14); 3: ‘Nanicão Comum’ (1); 4: ‘Grand Naine’ (1); 5: ‘IAC 2001’ (1); 6: ‘Prata Anã’; 7: ‘Maçã’. B – 1: ‘Jangada’, amostras J12; 2: ‘IAC 2001’ (2); 3: ‘Grand Naine’ (1); 4: ‘Grand Naine’ (2); 5: ‘Grand Naine’ (Itajaí-SC); 6: ‘Jangada’, amostras J13.

### 3.2.2. Amplificação por círculo rolante (RCA)

Os produtos do RCA foram digeridos com a enzima de restrição *KpnI*, obtendo-se de uma banda com aproximadamente 7,5 kb como esperado para o DNA genômico linear do BSV (Figura 8). Observou-se que nas reações de RCA ocorreram ampliações somente com a utilização dos *primers* Harper's 1A-4'.

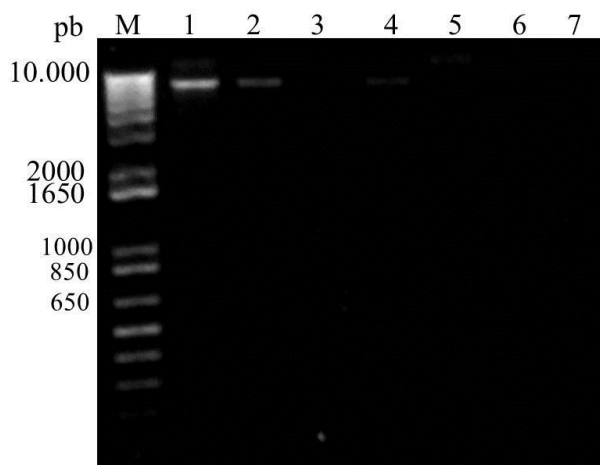


Figura 8. Fragmentos de DNA com aproximadamente 7,5 kpb obtidos por amplificação por círculo rolante (RCA), digeridos com *KpnI*, em bananeira da variedade Jangada 13. M: Marcador molecular – 1 Kb Plus DNA *Ladder* (Invitrogen®); 1, 2 e 3: amostras J13, com os *primers* Harper's 1A-4'; 4 e 5: amostra J13, com os *primers* Badna FP e Badna RP.

O fato da técnica de RCA ter amplificado um DNA de tamanho correspondente ao esperado para o genoma do BSV, ratifica sua eficiência na amplificação completa do genoma de vírus de DNA presentes no citoplasma de plantas infectadas, os quais estariam efetivamente associadas à doença, e não a amplificação de formas integradas, comumente obtidas nas reações de PCR.

Das sete amostras da variedade Jangada, provenientes das áreas de coleta, em quatro, não houve amplificação por RCA, amostras 1, 4, 7 e 14, já nas amostras 10, 12 e 13, as ampliações obtidas de 7,5 Kb (Figura 9), com tamanho esperado para o DNA genômico do BSV, poderiam indicar a presença da forma episomal do BSV nestas amostras.

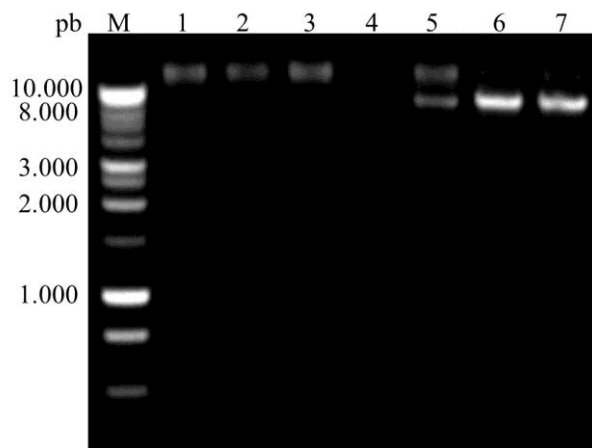


Figura 9. Fragmentos de DNA com aproximadamente 7,5 kpb obtidos por amplificação por círculo rolante (RCA), digeridos com a enzima de restrição *KpnI* em amostras de bananeiras da variedade Jangada, utilizando os *primers* Harper's 1A-4' para detecção do BSV. M: Marcador molecular – 1 Kb DNA *Ladder* (Promega®); 1 ao 7: amostras J1, J4, J7, J14, J10, J12 e J13.

Para as amostras de bananeiras micropropagadas *in vitro*, das variedades Grand Naine, Nanicão comum, Jangada e IAC 2001, foi detectada a presença de banda apenas na amostra 1 da variedade IAC 2001, indicando que, possivelmente, esta amostra estaria infectada com o BSV episomal (Figura 10).

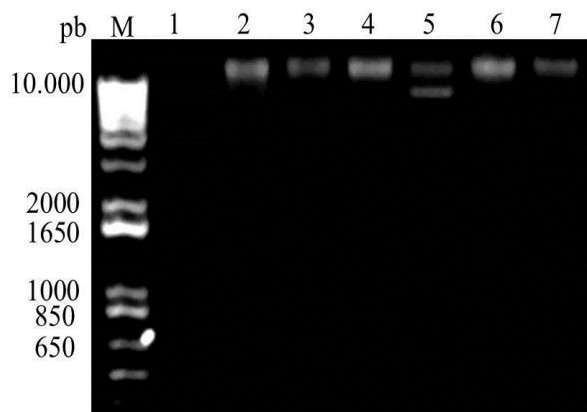


Figura 10. Fragmento de DNA com aproximadamente 7,5 kpb obtido por amplificação por círculo rolante (RCA), digerido com a enzima de restrição *KpnI*, utilizando o par de *primers* Harper's 1A-4' para detecção do BSV, em amostras de bananeiras micropropagadas *in vitro*. M: Marcador molecular – 1 Kb Plus DNA *Ladder* (Invitrogen®); 1: 'Grand Naine' (1); 2: 'Grand Naine' (2); 3: 'Nanicão Comum' (1); 4: 'Grand Naine' (Itajaí-SC); 5: 'IAC 2001' (1); 6: 'IAC 2001' (2); 7: 'Jangada' (3).

Após a digestão enzimática dos produtos de RCA obtidos a partir da amostra J-13, observou-se que os padrões de bandas obtidos com as enzimas *Kpn*I, *Bam*HI (1 banda), e *Xba*I (3 bandas), estavam de acordo com o esperado para o BSOLV, conforme James et al. (2011). Já com o tratamento desse produto de RCA com a enzima *Eco*RI, foram obtidas 3 bandas ao invés de 4 (Figura 11). Este fato pode ser o indicativo de uma ligeira variabilidade na sequência de nucleotídeos no genoma do isolado BSOLV analisado neste trabalho.

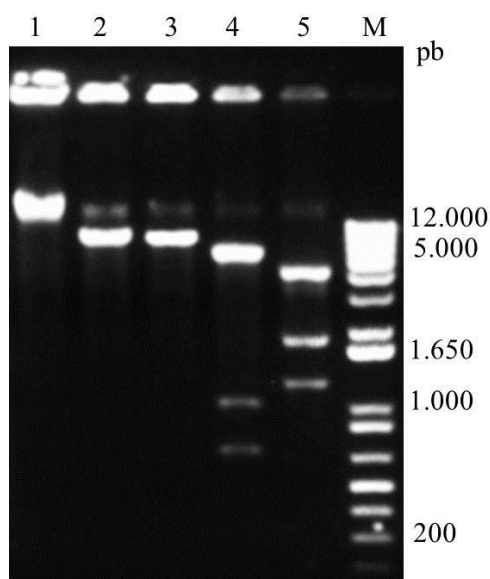


Figura 11. Análise de RCA (*Rolling-circle amplification*) com Harper's primers 1A-4' a partir de DNA extraído da amostra J-13, 1: produto de RCA, 2- Produto de RCA digerido com *Kpn*I, 3- Digerido com *Bam*HI, 4- Digerido com *Eco*RI, 5- Digerido com *Xba*I; M-1Kbp plus DNA Ladder (Invitrogen®).

A técnica RCA demonstra ter uma maior especificidade na detecção do BSV do que outras técnicas, pois permite a amplificação seletiva dos DNAs circulares no interior do tecido a ser indexado (BLANCO; SALAS, 1996). A elevada sensibilidade, confiabilidade e processabilidade da DNA polimerase Phi29, enzima envolvida nas amplificações, assegura diagnósticos mais precisos e confiáveis (WAMBULWA et al., 2012).

Por meio da RCA, James et al. (2011) e Wambulwa et al. (2012) puderam discriminar o BSV episomal do integrado, detectando em diversas cultivares de bananeiras sequências integradas e/ou episomais do *Banana streak Mysore virus* (BSMyV), *Banana streak OL virus* (BSOLV) e *Banana streak GF virus* (BSGFV), assim como o BSOLV episomal presente na amostra J-13, pode ser detectado neste trabalho.

### 3.3. Comparação de métodos de detecção do BSV em amostras de bananeiras

Foram comparadas quatro técnicas de detecção do BSV: o teste sorológico DAS-ELISA; a PCR convencional com os *primers* Badna PF-RF, Harper's 1A-4' e os *primers* 5345F-6681R, o qual deve detectar somente o BSV episomal (DELANOY et al., 2003); e a amplificação por círculo-rolante (RCA).

Na Tabela 2, são apresentados os resultados dos métodos de detecção viral em sete amostras de bananeiras das variedades Grand Naine, Nanicão comum, IAC 2001 e Jangada, micropropagadas *in vitro*.

Tabela 2. Detecção do BSV em variedades de bananeiras micropropagadas *in vitro*, utilizando os métodos de detecção: DAS-ELISA, PCR e (RCA) (Amplificação por círculo rolante).

Variedades de bananeiras	DAS-ELISA	PCR (PF-RF)	PCR (1A-4')	PCR (5345F-6681R)	RCA (1A-4')
GN (1)	-	+	+	-	-
GN (2)	-	+	+	-	-
NC (1)	-	+	+	-	-
GN (Epagri-SC)	-	+	+	-	-
IAC 2001 (1)	+	+	+	+	+
IAC 2001 (2)	+	+	+	+	-
JD (3)	-	+	+	-	-

Legenda – GN: variedade Grand Naine; NC: variedade Nanicão Comum; JD: variedade Jangada

Foi observado que, em todas as amostras, houve amplificações com os *primers* Badna PF-RF e Harper's 1A-4'. Já com os *primers* 5345F-6681R, ocorreram amplificações apenas nas amostras IAC 2001 (1 e 2), como também foram positivas através do DAS-ELISA.

O resultado positivo da RCA nos habilita a afirmar que, na amostra IAC (1), seguramente foi encontrada a forma episomal do BSV, uma vez que esta amostra também foi positiva no teste DAS-ELISA. Neste teste, o antissoro utilizado deve reagir com o capsídeo do BSV. Quanto às demais amostras, com exceção da amostra IAC (2), poderíamos afirmar seguramente que estas apresentam apenas formas do BSV integradas no genoma da bananeira.

Ao comparar os métodos de detecção para oito amostras de bananeira das variedades Jangada, Prata Anã e Maçã, coletadas no campo, pode-se observar que todas apresentaram resultados positivos com a PCR, utilizando os *primers* Badna PF-RF e Harper's 1A-4'.

Todavia, provavelmente foram detectadas tanto formas episomais como endógenos (Tabela 3).

Tabela 3. Detecção do BSV em amostras de bananeiras provenientes do campo, utilizando o DAS-ELISA, a PCR e RCA (Amplificação por círculo rolante).

Variedades de bananeiras	DAS-ELISA	PCR (Harper's 1A-4')	PCR (PF-RF)	PCR (5345F-6681R)	RCA (1A-4')
JD (1)	-	+	+	-	-
JD (4)	-	+	+	-	-
JD (10)	+	+	+	+	+
JD (12)	+	+	+	+	+
JD (13)	+	+	+	+	+
JD (14)	+	+	+	+	+
'Prata Anã'	+	+	+	+	+
'Maçã'	+	+	+	+	+

Legenda – JD: variedade Jangada

Quatro amostras da variedade Jangada (10, 12, 13, 14) e a amostra de Prata Anã, além de apresentarem os sintomas característicos de infecção por BSV, como a presença de estrias cloróticas ao longo da lâmina foliar, também foram positivas em todos os testes para detecção do BSV. Já a amostra de 'Maçã', apesar de não apresentar sintomas, todos os testes indicaram a presença de BSV nesta amostra, tanto na forma endógena, integrada ao genoma da bananeira, como em infecção episomal. Já as amostras 'Jangada' 1 e 4 teriam apenas formas integradas do BSV ao seu genoma.

O teste RCA indicou que 75% das amostras provenientes do campo apresentaram resultados positivos para o BSV episomal, enquanto que, para as amostras micropropagadas *in vitro*, apenas 17% foram positivas. A porcentagem menor da presença de BSV nas plantas micropropagadas talvez esteja relacionada à seleção prévia das plantas submetidas ao processo de micropropagação *in vitro*, cujos rizomas foram provenientes de plantas em estágio vigoroso de desenvolvimento e ótimo estado fitossanitário.

Por outro lado, como todas as variedades micropropagadas pertencem ao grupo Cavendish, Nanicão (AAA), neste grupo, ainda não foi reportada a ocorrência de BSVs endógenos ativáveis (eaBSVs), os quais até agora foram detectados apenas no genoma B da bananeira (GEERING et al., 2000). Segundo Wambulwa et al. (2012), sequências integradas

ao genoma geralmente não são infecciosas e, portanto, não podem ser ativadas pelo estresse ocasionado pela cultura de tecidos.

Nas amostras de ‘Maçã’ (AAB) e ‘Prata Anã’ (AAB), provavelmente tenha sido detectada a infecção episomal, originada por formas endógenas ativáveis (eaBSVs), que consiste em um genoma funcional completo de BSV episomal combinado com sequências da hospedeira, que, sob determinadas condições de estresse, particularmente a cultura de tecidos, podem levar à ocorrência de eventos de recombinação de sequências integradas, o que permitiria que o genoma viral reconstituído fosse ativado, resultando, assim, em infecções episomais, conforme sugerido por James et al. (2011).

Silva Neto e Silva (2009) afirmam que a presença de sequências de DNA do BSV integradas no genoma da bananeira, caso não ocorra replicação viral, seriam detectadas apenas através da PCR e não pelos testes sorológicos. Porém, se ocorrer replicação viral, tanto a PCR quanto os métodos sorológicos poderiam detectar o BSV. Assim, um resultado de detecção de BSV positivo por PCR e negativo por ELISA indicaria que há integração sem a ocorrência de replicação viral que resulte em doença. Isso acabaria complicando e dificultando a indexação do BSV em bananeira.

#### **3.4. Sequenciamento para identificação do isolado viral**

O sequenciamento de 961 pb do clone contendo o fragmento de RCA com cerca de 1,2 kbp proveniente da reação de restrição enzimática com *Xba*I e de um dos produtos de PCR com 588 pb, obtido na amplificação com os *primers* Harper’s 1A-4’, indicou 100% de similaridade com duas sequências endógenas de *Badnavirus* em *Musa balbisiana* da Austrália, números de acesso AY189435 e AY452266 (Tabela 4). Isto é esperado, pois no genoma da bananeira é comum a integração de sequências parciais ou integrais do BSV (JAMES et al., 2011).

Tabela 4. Acessos do GenBank de isolados do *Banana streak virus* utilizados na comparação com sequências do BSV da bananeira ‘Jangada’13.

Espécies	Hospedeiras	Origem	Nº de acesso	Similaridade com o BSV (%)
<i>Musa balbisiana endogenous badnavirus clone Bat9</i>	<i>Musa</i> sp.	Austrália	AY189435	100
<i>Musa (ABB) endogenous virus badnavirus clone KT37</i>	<i>Musa</i> sp.	Austrália	AY452266	100
<i>Musa (ABB) Musa 6 banana streak virus sequence.</i>	<i>Musa</i> sp.	USA	AF106946	99
<i>Banana streak Obino l'Ewai</i>	<i>Musa</i> sp.	Uganda	AJ968422	99
<i>Banana streak virus</i>	<i>Musa</i> sp.	Colombia	EU076424	99
<i>Banana streak virus Udhayam</i>	<i>Musa</i> sp.	Índia	JQ911619	98
<i>Banana streak virus</i>	<i>Musa</i> sp.	China	FJ594889	98
<i>Musa acuminata (Endogenous virus Banana streak CA vírus)</i>	<i>Musa</i> sp.	China	JX158336	97

Também foi obtida 99% de similaridade com o isolado *Banana streak Obino l'Ewai* (AJ968422), de Uganda. Essa alta similaridade também foi detectada em isolados do BSV de outros locais do mundo, como EUA, Uganda, Colômbia, Índia e China, como pode ser observado na Tabela 4.

Para determinação do posicionamento filogenético do BSV isolado em Andirá-PR, a sequência do isolado ‘Jangada’ 13 foi comparada com sequências de espécies definitivas do BSV, conforme reconhecidas pelo *International Committee on Taxonomy of Viruses* (ICTV), segundo Brioso (2012): *Banana streak Mysore virus* (BSMysV), *Banana streak Obino l'Ewai virus* (BSOLV), *Banana streak Goldfinger virus* (BSGFV), *Banana streak virus Acuminata Vietnam* (BSVSAV) e com algumas ainda não definitivamente reconhecidas, como o *Banana streak cavendish virus* (BaSCAV), *Banana streak Imove virus* (BSImV) e *Banana streak Uganda M virus* (BSUgMV), depositadas no GenBank (Tabela 5).



Tabela 5. Acessos de sequências de BSV depositadas no GenBank utilizadas na análise filogenética com sequências do isolado de bananeira ‘Jangada’ 13, proveniente de Andirá-PR.

Espécies	Origem	Nº de acesso
<i>Banana streak Mysore virus</i> (BSMysV)	Austrália	NC006955
<i>Banana streak Obino l'Ewai virus</i> (BSOLV)	Uganda	AJ96843
<i>Banana streak Goldfinger virus</i> (BSGFV)	Uganda	AJ968443
<i>Banana streak virus Acuminata Vietnam</i> (BSVSAV)	Vietnam	NC007003
<i>Banana streak Cavendish virus</i> (BaSCAV)	Kenya	NC015506
<i>Banana streak Imove virus</i> (BSImV)	Uganda	AJ968451
<i>Banana streak Uganda M virus</i> (BSUgMV)	Uganda	AJ968558

Segundo Brioso (2012), no Brasil, prevalece o *Banana streak UB vírus* (= *Banana streak Brazil 1 virus*) em híbridos de *Musa* spp. (grupos AAA, AAB, ABB, AAAB, AABB), sendo encontrado nos Estados do Acre, Amazonas, Bahia, Ceará, Goiás, Minas Gerais, Piauí, Rio de Janeiro, Rondônia, Santa Catarina, São Paulo. Outro isolado foi detectado nos Estados do Amazonas e Ceará, em *Musa* spp. (grupo AAAB) cv. Pacovan Apodi, sendo denominado de *Banana streak Brazil 2 virus*. No Ceará, também foi encontrado em *Musa* spp. (grupo AAAB) cv. Fhia-21 o *Banana streak Brazil 3 virus* e, no Estado do Amazonas, em *Musa* spp. (grupo ABB) cv. Prata Zulu, o *Banana streak PZ virus*.

Já o isolado ‘Jangada’ 13 do Paraná agrupou-se no mesmo clado do *Banana streak Obino l'Ewai virus* (BSOLV) (Figura 12).

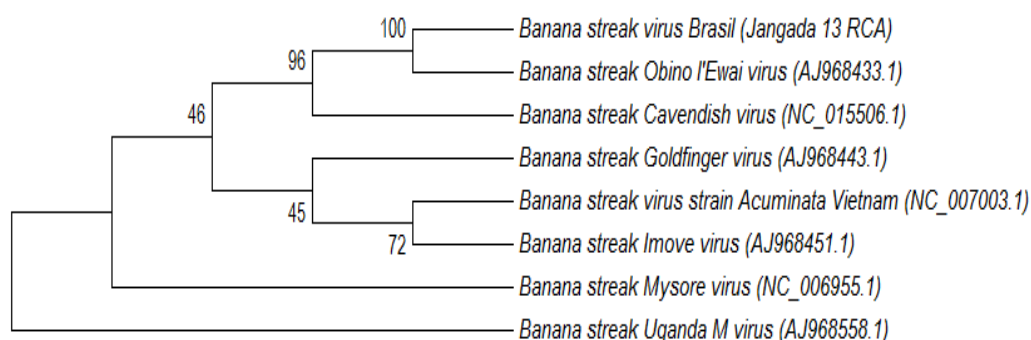


Figura 12. Árvore filogenética construída a partir do alinhamento de parte dos nucleotídeos do isolado ‘Jangada’ 13 (600 pb), correspondendo a uma região da ORF III que codifica a transcriptase reversa (RT) e a ribonuclease H. Foram comparadas seqüências de BSV de diversas origens. Os números sobre os ramos indicam a porcentagem de repetições obtidas nas análises de *bootstrap* (1.000 repetições).

Embora seja afirmado que não haveriam evidências seguras da ocorrência do BSOLV no Brasil (Brioso, 2012), poderíamos afirmar que os dados de sequenciamento de produtos de RCA, obtidos neste trabalho, reforçam que o BSOLV de fato está presente no Brasil, sendo constatada a sua ocorrência no norte do Paraná.

#### 4. CONCLUSÕES

O BSV encontra-se presente em áreas de cultivo de bananeiras do norte do Paraná, o que pode ser comprovado através da detecção da forma episomal do vírus, e o isolado identificado é um *Badnavirus* da espécie *Banana streak Obino l'Ewai virus* (BSOLV).

## 5. REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, A. M. R.; LIMA, J. A. A. Técnicas sorológicas aplicadas à fitovirologia. In: ALMEIDA, A. M. R.; LIMA, J. A. A. (Eds.) **Princípios e técnicas de diagnose aplicadas em Fitovirologia**. Fortaleza: SBF, 2001. p. 33-62.
- BLANCO, L.; SALAS, M. Relating Structure to Function in Phi29 DNA Polymerase, **Journal of Biological Chemistry**, v. 271, n. 15, p. 8509-8512, 1996.
- BRIOSO, P. S. T. *Badnavirus* e seu controle. In: 45° Congresso Brasileiro de Fitopatologia, 45., 2012, Manaus. **Anais... Tropical Plant Pathology, 37** (Suplemento), Manaus: Sociedade Brasileira de Fitopatologia, 2012. p.1-19.
- DELANOY, M.; SALMON, M.; KUMMERT, J.; FRISON, E.; LEPOIVRE, P. Development of realtime PCR for the rapid detection of episomal *Banana streak virus* (BSV). **Plant Disease**, v. 87, p. 33-38, jan. 2003.
- GAYRAL, P.; NOA-CARRAZANA, J. C.; LESCOT, M.; LHEUREUX, F.; LOCKHART, B. E. L.; MATSUMOTO, T.; PIFFANELLI, P.; ISKRA-CARUANA, M. L. A single *Banana streak virus* integration event in the banana genome as the origin of infectious endogenous pararetrovirus. **Journal of Virology**, v. 82, n. 13, p. 6697–6710, jul. 2008.
- 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, ago. 2000.
- HARPER, G.; DAHAL, G.; HULL, R. Detection of *Banana streak virus*. In: MARSHALL, G. (Ed.), *Diagnostics for Crop Protection*. BCCP Proceedings 65, BCCP, Surrey, UK, p. 47–51, 1996.
- HARPER, G.; DAHAL, G.; THOTTAPPILLY, G.; HULL, R. Detection of episomal *Banana streak badnavirus* by IC-PCR; **Journal of Virological Methods**, v. 79, n. 1, p. 1–8, abr. 1999.
- HARPER, G.; HART, D.; MOULT, S.; HULL, R. Detection of *Banana streak virus* in field samples of bananas from Uganda. **Annals of Applied Biology**, London, v. 141, n. 3, p. 247-257, 2002.
- 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.
- HARPER, G.; HULL, R.; LOCKHART, B. E. L.; OLSZEWSKI, N. Viral Sequences Integrated into Plant Genomes, **Annual Review of Phytopathology**, v. 40, p. 119-136, set. 2002.
- JAMES, A. P.; GEIJSKES, R. J.; DALE, J. L.; HARDING, R. M. Development of a novel rolling-circle amplification technique to detect *Banana streak virus* which also discriminates between integrated and episomal virus sequences. **Plant Disease**, v. 95, n. 1, p. 57-62, 2011.

LOCKHART, B. E. L.; JONES, D. R. *Banana mosaic* and *Banana streak*, diseases caused by viruses. In: JONES DR (Ed.) Diseases of banana, Abaca and Enset. **CAB Int**, Wallingford, UK, 2000. p. 241–293.

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, 2010.

MEISSNER FILHO, P.; BRIOSO, P. S. T. Doenças causadas por vírus. In: CORDEIRO, Z. J. M. (Org.). **Banana: Fitossanidade**. Cruz das Almas: EMBRAPA-Mandioca e Fruticultura. – Brasília, DF: EMBRAPA-Comunicação para Transferência de Tecnologia, v. 1, p. 78-82, 2000.

SILVA NETO, S. P.; SILVA, M. S. **Cultura de tecidos no controle de viroses no Brasil**. Planaltina: EMBRAPA-Cerrados, 2009. (Documento 274), 29p.

WAMBULWA, M.; WACHIRA, F.; KARANJA, L.; MUTURI, S. 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**, v. 3, n. 11, p. 1581-1587, 2012.

YANG, I. C.; HAFNER, G. J.; REVILL, P. A.; DALE, J. L.; HARDING, R. M. Sequence diversity of South Pacific isolates of *Taro bacilliform virus* and the development of a PCR-based diagnostic test. **Archives of Virology**, v. 148, p. 1957-1968, 2003.