



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE SANTANA**



**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

**CAMILA NOGUEIRA PESTANA CALDAS**

**Detecção de espécies do vírus das estrias da bananeira  
(BSV) em *Musa* spp.**

Feira de Santana, BA  
2019

**CAMILA NOGUEIRA PESTANA CALDAS**

**Detecção de espécies do vírus das estrias da bananeira  
(BSV) em *Musa* spp.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, da  
Universidade Estadual de Feira de Santana como requisito parcial para  
obtenção do título de Doutor em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Edson Perito Amorim

Co-Orientadora: Dra. Cláudia Fortes Ferreira

Co-orientadora: Dra. Vanusia B. de Oliveira Amorim

Feira de Santana, BA  
2019

Ficha Catalográfica - Biblioteca Central Julieta Carteado - UEFS

C15

Caldas, Camila Nogueira Pestana

Detecção de espécies do vírus das estrias da bananeira (BSV) em *Musa* spp. /  
Camila Nogueira Pestana Caldas. – 2019.

99 f.: il.

Orientador: Edson Perito Amorim.

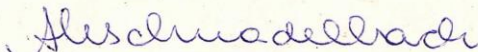
Coorientadoras: Cláudia Fortes Ferreira e Vanusia Batista de Oliveira Amorim.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Feira de Santana, Programa de Pós-  
graduação em Biotecnologia, Feira de Santana, 2019.

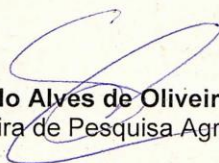
1. *Musa* spp. 2. Bananeira – vírus das estrias. 3. Banana streak virus (BVS).  
4. Indexação. I. Amorim, Edson Perito, orient. II. Ferreira, Cláudia Fortes, coorient.  
III. Amorim, Vanusia Batista de Oliveira, coorient. IV. Universidade Estadual de  
Feira de Santana. V. Título.

CDU: 634.773:578

## BANCA EXAMINADORA



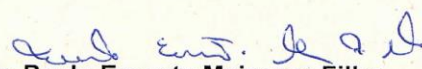
**Dr.<sup>a</sup> Alessandra Selbach Schnadelbach**  
(Universidade Federal da Bahia)



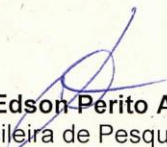
**Dr. Saulo Alves de Oliveira**  
(Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária)



**Dr. Luiz Cláudio Costa da Silva**  
(Universidade Estadual de Feira de Santana)



**Dr. Paulo Ernesto Meissner Filho**  
(Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária)



**Dr. Edson Perito Amorim**  
(Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária)

**Feira de Santana – BA**  
**2019**

Aos meus pais, em especial minha mãe que despertou a guerreira em mim;  
Às minhas irmãs, Karla, Kátia, Renata e Rafaela, que amo muito.

### **Dedico**

Ao meu esposo, Fábio, pelo seu amor, amizade, incentivo e paciência;  
Às minhas filhas Sophia e Alice, amor que não se mede.

### **Ofereço**

**“Tudo posso naquele que me fortalece”**

**Filipenses 4:13**

## **AGRADECIMENTOS**

À Deus por me conceder a vida, me ensinando a lutar sempre para que possa alcançar meus objetivos, dando-me força, coragem, determinação e perseverança na busca por meus ideais.

Às minhas filhas amadas...perdão meus amores... pela ausência...faço tudo por vocês!! Mamãe as ama mais que tudo!

Aos meus pais, Antonio e Marinalva, pela luta ao longo de sua vida em prol da minha formação moral e intelectual e de todas as minhas irmãs.

Ao meu esposo, Fábio, pelo seu amor, companheirismo, paciência e incentivo em todos os momentos.

Às minhas irmãs, Rosa Karla, Kátia, Renata e Rafaela pelo carinho e apoio. Amo muito vocês.

À minha querida irmã Kátia pela ajuda e ensinamentos na realização deste trabalho. Te amo mana.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES, pela concessão da bolsa de estudos.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Estadual de Feira de Santana, pela oportunidade de realização do curso.

A Dra. Vanusia Amorim, pela confiança, paciência e ajuda fundamental para realização deste trabalho e pelos ensinamentos que muito contribuíram para a minha formação profissional.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Edson Perito Amorim, pela confiança, paciência, apoio e ensinamentos na elaboração deste trabalho. Muito obrigada!

À minha co-orientadora Dra. Cláudia Fortes Ferreira, pelos ensinamentos e colaboração para a realização deste trabalho.

À Professora Dra. Edna Lôbo Machado, obrigada pelos ensinamentos e pela amizade.

À Dra. Elaine pela força e amizade concedida.

A todos os colegas do Laboratório de Biologia Molecular, em especial Vanderson e Andresa pelos momentos de descontração e aprendizagem durante os anos de convivência.

A todos que aqui não foram citados, mas que, de alguma forma, contribuíram para realização deste trabalho.

Muito obrigada!

## Sumário

<b>RESUMO</b> .....	<b>3</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>4</b>
<b>1. INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	<b>5</b>
1.1 Importância econômica e social da bananeira .....	5
1.2 Principais fatores limitantes à produção: fitopatógenos .....	5
1.3 Vírus das estrias da bananeira (Banana Streak Vírus- BSV) .....	7
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>12</b>
<b>Deteção e caracterização molecular de espécies do Vírus das Estrias da Bananeira (BSV) em acessos da coleção de germoplasma de bananeira da Embrapa</b> .....	<b>18</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>20</b>
<b>2. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>22</b>
2.1. Material vegetal e extração de DNA.....	22
2.2. Descrição dos primers espécie-específicos .....	23
2.3. PCR multiplex .....	23
2.4. Indexação por IC-PCR + DNase .....	25
<b>2.4.1. Material Vegetal</b> .....	<b>25</b>
<b>3. RESULTADOS E DISCUSSÕES</b> .....	<b>26</b>
<b>4. CONCLUSÕES</b> .....	<b>37</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>39</b>
<b>Levantamento e indexação de espécies do Vírus das Estrias da Bananeira (BSV) em regiões produtoras de banana do Brasil</b> .....	<b>47</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>49</b>
<b>2. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>50</b>
2.2. Descrição dos primers espécie-específicos .....	51
2.3. PCR multiplex .....	51
2.4. Indexação por IC-PCR + DNase .....	52
<b>3. RESULTADOS</b> .....	<b>53</b>
3.1. Deteção de espécies de BSV das diferentes regiões produtoras de banana do Brasil.....	53
<b>3.2. Indexação por meio de IC-PCR das amostras de diferentes regiões produtoras do Brasil</b> .....	<b>55</b>
<b>4. DISCUSSÃO</b> .....	<b>57</b>
<b>5. CONCLUSÕES</b> .....	<b>59</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>60</b>



<b>Detecção de fragmentos infecciosos de eBSV com <i>primers</i> alelicos espécie-específicos em genótipos comerciais de banana e diploides BB .....</b>	<b>66</b>
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>69</b>
<b>2. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>71</b>
<b>3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>74</b>
<b>4. CONCLUSÃO .....</b>	<b>80</b>

## RESUMO

No Brasil, o clima favorável possibilita a produção de banana em todo território. No entanto, alguns fitopatógenos prejudicam a produção da banana, tais como fungos, nematóides, insetos e vírus, comprometendo a produtividade e a qualidade final dos frutos. Entre as viroses mais comuns, destaca-se o vírus das estrias da bananeira (BSV), que possui mais de quinze diferentes espécies identificadas em todo o mundo. O presente estudo teve como objetivos realizar um levantamento das espécies de BSV presentes no Banco Ativo de Germoplasma de Banana da Embrapa e em diferentes regiões produtoras de banana do Brasil, por meio da caracterização molecular e indexação a partir do uso da técnica IC-PCR (Immunocapture-PCR) +DNase, bem como mapear a presença de fragmentos infectivos no germoplasma comercial e diploides BB com potencial de uso em cruzamentos. Para tanto, foram coletadas amostras de folhas de 300 acessos de bananeira da coleção de germoplasma da Embrapa provenientes do cultivo *ex situ* e 39 amostras do cultivo *in vitro*. Também foram coletadas 237 amostras provenientes de oito diferentes regiões produtoras de banana do Brasil. Para a análise de incidência e prevalência de espécies do vírus, foram utilizados 23 iniciadores espécie-específicos para detectar a presença do vírus das estrias da bananeira endógeno (eBSV), a saber *Goldfinger* (eBSGFV), *Imovè* (eBSIMV) e *Obinol'Ewai* (eBSOLV). A análise dos 300 acessos do BAG permitiu observar que a maioria apresentou resultados negativos quanto à presença do eBSV. Das amostras de bananeira positivas, 20 apresentaram infecção por BSV epissomal das espécies BSOLV e BSGFV. Nenhuma amostra apresentou o BSV epissomal da espécie BSIMV. Dentre os acessos do cultivo *in vitro* indexados não foi constatado a presença do BSV epissomal das espécies BSGFV e BSIMV. Também se observou que a maioria das amostras analisadas das oito diferentes regiões produtoras do Brasil foi positiva para a presença de ao menos uma espécie de eBSV e apenas as amostras dos Estados de São Paulo e outra de Santa Catarina apresentaram a presença do BSV epissomal. O estudo com os híbridos desenvolvidos pela Embrapa identificou a presença do fragmento infectivo GF7 associado à espécie BSGFV. Em se tratando da presença do fragmento infectivo associado à espécie BSOLV, apenas a cultivar Thap Maeo mostrou-se positiva. Os outros genótipos amplificaram apenas o fragmento não infectivo OL2. Observou-se que todos os oito acessos de genoma BB apresentam tanto o fragmento viral infeccioso para a espécie BSOLV quanto o fragmento infeccioso para a espécie viral BSGFV. A indexação por IC-PCR + DNase confirmou a baixa presença do BSV epissomal observado nas amostras analisadas.

**Palavras-Chave:** Bananeira; indexação; *Banana Streak Goldfinger Vírus*; *Banana Streak Obinol'Ewai Vírus*; *Banana Streak Imovè Vírus*.

## ABSTRACT

In Brazil, the optimal climate conditions enable banana production in the entire country. However, some phytopathogens such as fungi, nematodes, insects and virus compromise yield and fruit quality. Among the virus diseases, banana streak virus (BSV) is the most important, whereas more than fifteen different species have been identified worldwide. The objectives of the present study were to identify BSV species in germplasm bank of Embrapa and in different banana production regions in Brazil by molecular characterization and indexation using IC-PCR (Immunocapture-PCR) + DNase, as well as map the presence of infective fragments in commercial germplasm and those of genome BB used in the crosses. Leaves of 300 banana accessions from the Embrapa *ex situ* germplasm collection and 39 *in vitro* samples, were collected. Two-hundred and twenty-seven samples from eight different banana production regions in Brazil, were also collected. Twenty-three species-specific primers for detection of endogenous BSV (eBSV) for species Goldfinger (eBSGFV), Imovè (eBSIMV) and Obinol'Ewai (eBSOLV) were also used for the analysis of incidence and prevalence of viral species. The analysis of the 300 accessions of BAG showed that most samples were negative for eBSV and of the positive banana samples for eBSV, 20 were infected by episomal BSV of the BSOLV and BSGFV species. None of the analyzed samples contained BSV episomal of the BSIMV species. Most of the samples analyzed from the eight different banana producing regions in Brazil was positive for the presence of at least one of the eBSV species and only samples from the State of São Paulo and one from Santa Catarina presented episomal BSV. The study with hybrids developed by Embrapa identified presence of the infective fragment GF7 associated to the BSGFV species. Regarding the presence of the infective fragment associated to the BSOLV species, only the Thap Maeo cultivar was positive. The other genotypes amplified only the non-infective fragment, OL2. All eight accessions with BB genome presented either the infective fragment for the BSOLV species as well as for the BSGFV species. The IC-PCR + DNase indexation confirmed the low presence of episomal BSV in the analyzed samples.

**Key-words:** Banana plant; indexation; *Banana Streak Goldfinger Vírus*; *Banana Streak Obinol'Ewai Vírus*; *Banana Streak Imovè Vírus*.

## **1. INTRODUÇÃO GERAL**

### **1.1 Importância econômica e social da bananeira**

A banana possui importância econômica e social, constituindo-se na principal fonte de riqueza em muitas regiões do mundo, proporcionando emprego e renda para toda a cadeia produtiva. A bananicultura é essencialmente realizada por pequenos e médios produtores, que tem na fruteira produção constante ao longo do ano (RIBEIRO et al., 2013).

A fruta assume posição de destaque na produção mundial de alimentos, posicionando-a entre os oito cultivos agrícolas mais importantes do mundo (SEYDOU et al., 2017). Em 2018, a produção mundial alcançou 113 milhões de toneladas, correspondendo a um valor bruto de produção (VBP) de aproximadamente 130 bilhões de Reais (FAOSTAT, 2018).

O Brasil ocupa a quarta posição no cenário mundial, com aproximadamente 7 milhões de toneladas produzidas em 470 mil hectares, o que representa um VBP de 15,7 bilhões de Reais, correspondendo a 2,5% da riqueza gerada pela produção agrícola brasileira, reforçando a sua importância para o agronegócio nacional (FAOSTAT, 2018).

A produção de banana está presente em todo território nacional, com destaque para os Estados de São Paulo, Bahia, Minas Gerais e Santa Catarina, que juntos produzem 53% da produção nacional (IBGE, 2018). O estado da Bahia é o segundo produtor do país, com 1,1 milhão de toneladas produzidas na safra de 2016, representando 16% da produção nacional; já o município de Bom Jesus da Lapa (BA) é considerado o município maior produtor individual da fruta no país (IBGE, 2018).

### **1.2 Principais fatores limitantes à produção: fitopatógenos**

As doenças causadas por fungos são as mais comuns em bananeira, com destaque para os fungos causadores da Sigatoka-negra, Sigatoka-amarela e murcha de Fusarium raças 1, 2 e 4 (JONES, 2000).

A sigatoka-negra é causada pelo fungo *Mycosphaerella fijiensis* Morelet [forma assexuada: *Pseudocercospora fijiensis* (Morelet) Deighton]. É a mais temida doença da bananicultura mundial, uma vez que na ausência de controle genético ou químico as perdas podem alcançar 100% da produção ou mesmo causar a diminuição do número de pencas por cacho, redução do tamanho e maturação precoce dos frutos e perfilhamento lento. As cultivares dos subgrupos Prata, Cavendish e os Plátanos são severamente atacadas pelo patógeno (CORDEIRO et al., 2014).

A Sigatoka-amarela tem como agente causal o fungo *Mycosphaerella musicola*, Leach (forma sexuada) e *Pseudocercospora musae* (Zimm) Deighton (forma imperfeita) (CORDEIRO et al., 2014). Seu primeiro relato foi realizado na Ilha de Java, em 1902, mas somente em 1913 mostrou importância econômica em áreas de produção nas Ilhas Fiji. No Brasil, sua primeira observação em campo deu-se em 1944, na região amazônica (KIMATI e GALLI, 1980).

A murcha de Fusarium causada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* – Foc (E. F. Smith) também representa um sério problema à bananicultura brasileira e mundial. A ‘Prata-Anã’ e seleções advindas dessa cultivar (Prata Catarina, Prata Rio, Prata Gorutuba, etc.) têm apresentado sérios problemas com Fusarium raça 1 nos principais polos de produção da fruta no Brasil, fazendo com que parte da produção seja perdida. A cultivar Maçã tem sido dizimada devido à elevada suscetibilidade à murcha de Fusarium.

A raça 4 tropical de Foc tem afetado de forma significativa a produção de banana na Ásia e África, causando doença em cultivares do subgrupo Cavendish, reconhecidas como resistentes a raça 1 do fungo (ZHANG et al., 2018). De acordo com PLOETZ, (2005) aproximadamente 80% das cultivares em uso pelos agricultores são suscetíveis a essa raça, incluindo as principais cultivares adotadas no Brasil. Em 08 de agosto de 2019 a doença foi oficialmente diagnosticada na América Latina, na Colômbia.

Doenças de etiologia bacteriana também são responsáveis por causar perdas na cultura da banana, sendo as mais relevantes o moko ou murcha bacteriana, causada pela bactéria *Ralstonia solanacearum* Smith

(*Pseudomonas solanacearum*), raça 2, e *Erwinia carotovora* subsp. *Carotovora* (CORDEIRO et al., 2016).

A cultura da bananeira também pode ser afetada por viroses. No Brasil, ocorrem o vírus das estrias da bananeira (*Banana streak Vírus*, BSV) e o vírus do mosaico do pepino (*Cucumber mosaic Vírus*, CMV). O primeiro é transmitido, em condições de campo, por mudas disseminadas e ou por cochonilhas; enquanto que o segundo tem nos afídeos o seu vetor (CORDEIRO et al., 2014).

### 1.3 Vírus das estrias da bananeira (Banana Streak Vírus- BSV)

O vírus das estrias da bananeira dificulta o intercâmbio de germoplasma (FIGUEIREDO et al., 2006); pertence à família *Caulimoviridae*, ordem *Ortervirales* e ao gênero *Badnavirus*. É considerado um pararetrovírus, pois durante o processo de replicação seu genoma é diretamente transcrito em mRNA, podendo ser utilizado como molde para a síntese de novas moléculas de DNA do vírus, a partir da ação da enzima transcriptase reversa (HARPER et al., 2005; ISKRA-CARUANA et al., 2014). O vírus apresenta partícula baciliforme não envelopada, contendo um genoma circular, de fita dupla de DNA, organizado em três ORF'S (*Open Reading Frames*), sendo que as ORF I e II codificam duas proteínas de função ainda desconhecida; já a ORF III codifica uma poliproteína que posteriormente é clivada em RNase H, capa proteica, proteínas de movimento, transcriptase reversa e *aspartyl protease* (ALVES, 2013; ISKRA-CARUANA et al., 2014; NOUMBISSIE-TOUKO, 2014).

O principal sintoma na bananeira são as estrias foliares cloróticas descontínuas que progressivamente tornam-se necróticas. Outros sintomas são observados, tais como a má formação dos frutos, a diminuição do número de cachos e do número de frutos por cacho e em casos graves, o apodrecimento do pseudocaule, levando à morte da planta (SANT'ANA, 2013; NOUMBISSIE-TOUKO, 2014) (Figura 1). A transmissão do vírus pode ocorrer por meio de vetores de transmissão, as cochonilhas (*Planococcus citri* Risso), sendo esta última o vetor de transmissão mais comum (NOUMBISSIE-TOUKO, 2014).

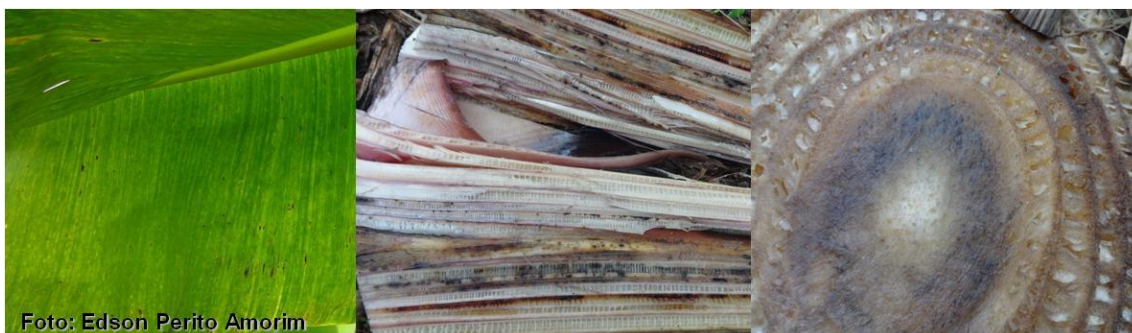


Figura 1. Sintomatologia observados em plantas de bananeira com a presença do vírus das estrias da bananeira (BSV).

Existem dois tipos de integração do BSV em *Musa* spp.. Um primeiro tipo, no geral onde a sequência viral é incompleta e incapaz de causar a infecção, uma vez que é considerada disfuncional, geralmente é encontrada tanto em espécies de *Musa acuminata* Colla (genoma A) quanto em espécies de *Musa balbisiana* Colla (genoma B). O segundo tipo de integração viral é uma sequência viral completa e funcional, que em situações de estresses bióticos e ou abióticos, podem desencadear a infecção na planta; esse tipo de integração é comum à espécie *M. balbisiana* (genoma B) (GEERING et al., 2001).

Para o agronegócio brasileiro da banana é fundamental o uso de cultivares livres do vírus integrado no genoma B, demanda que pode ser atendida por meio do melhoramento genético baseado em cruzamentos e seleção nas progênies (SILVA et al., 2013). O genoma B faz parte do genótipo de importantes cultivares de bananeira, como as variedades de bananeira mais plantadas no Brasil: Pacovan (AAB) e Prata-Anã (AAB). Estas são amplamente utilizadas no mercado interno; são consideradas de alta produtividade, apresentam tolerância à seca e estão entre as preferidas dos consumidores (DONATO et al., 2003).

A bananeira é uma planta que se propaga vegetativamente, no entanto, o fato de sequências do vírus das estrias da bananeira estarem integradas no DNA da bananeira, prejudica os principais métodos de indexação do vírus, podendo, na maioria das vezes, levar a resultados falso-positivos/negativos, a depender do grau de estringência da metodologia e com isso invalidar o uso das mudas indexadas. Portanto, ter-se disponível ferramentas moleculares capazes de identificar partículas virais de forma robusta e confiável para

subsidiar a seleção de parentais livres das sequências integradas do BSV para uso em cruzamentos, é de suma importância (SILVA et al., 2013).

Alguns métodos aplicados para o diagnóstico do BSV, como a reação em cadeia da polimerase (PCR) e os sorológicos, muitas vezes apresentam limitações. As técnicas de ELISA (*Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay*) e ISEM (*Immuno Sorbent Electron Microscopy*), que tem como alvo identificar proteínas da capa proteica, podem ser utilizadas na identificação do BSV epissomal presente em bananeiras (HARPER et al., 1999). Entretanto, antissoros específicos contra o BSV para realizar estes testes são obtidos com dificuldade, devido à baixa concentração viral, falta de hospedeiros experimentais e dificuldade para a purificação de grande quantidade do vírus (AGINDOTAN et al., 2003).

A PCR tem sido utilizada em numerosos estudos para a detecção de *Badnavirus* porém, como citado anteriormente, a presença de EPRV's no genoma da bananeira dificulta a detecção da infecção epissomal do BSV por PCR convencional, visto que a técnica pode amplificar tanto o DNA endógeno quanto o epissomal (Le PROVOST et al., 2006). Com o passar dos anos novos métodos baseados na ação conjunta entre PCR e sorologia foram aprimorados e atualmente um método denominado IC-PCR (reação em cadeia da polimerase associada a imunocaptura) tem proporcionado resultados confiáveis e precisos para diagnose de vírus que possuem sequências virais incorporadas no genoma da planta, como o BSV. Essa técnica combina uma etapa de captura imunológica das partículas dos vírus com um antissoro policlonal específico para BSV, com a subsequente amplificação de sequências do DNA viral, utilizando sequências de *primers* espécies-específicos. Como vantagem sobre a PCR convencional, os vírus infectivos (epissomais) podem ser diagnosticados, eliminando o diagnóstico dos vírus integrados ao DNA da planta (HARPER et al., 1999, ISKRA-CARUANA et al., 2014).

A técnica de amplificação por círculo rolante (*Rolling Circle Amplification* - RCA) é utilizada para amplificar e caracterizar as moléculas circulares de DNA, incluindo plasmídeos (DEAN et al., 2001; REAGIN et al., 2003) e diversos gêneros de vírus de DNA que infectam humanos, animais e plantas (JOHNE et al., 2009). A aplicação de RCA para vírus infectando plantas tem sido limitada a



pequenos genomas de DNA de fita simples, como nas famílias *Geminiviridae* e *Nanoviridae*. A descrição, o desenvolvimento e o uso da técnica RCA para a detecção do BSV foram realizados por JAMES et al. (2011), demonstrando que o método é capaz de discriminar as sequências do DNA do BSV integrado (EPRVs) e episomal; entretanto a metodologia tem elevado custo e é extremamente laboriosa. Além disso, os métodos sorológicos se tornam cada vez mais ineficazes devido à grande diversidade genética desses vírus e o surgimento frequente de novas espécies para as quais não existe a disponibilidade de antissoros (GEERING et al., 2000, 2005; HARPER e HILL, 1998; LHEUREUX et al., 2007). Em sua maioria, os testes sorológicos não são capazes de distinguir as espécies virais devido a heterogeneidade sorológica, podendo gerar resultados falso-negativos. Já os métodos moleculares, sem o uso de *primers* espécie-específicos, podem detectar sequências endógenas disfuncionais, gerando resultados falso-positivos (FIGUEIREDO et al., 2006; ALVES, 2013).

Dado esse panorama complicado de indexação do BSV em bananeira, pesquisadores do CIRAD (Centro de Cooperação Internacional em Pesquisa Agrônômica para o Desenvolvimento-França) desenvolveram três classes de *primers* espécie-específicos capazes de identificar as integrações virais e diferenciar as principais espécies do vírus das estrias da bananeira (BSV) comumente encontradas no genoma de bananeira, a citar: *Banana Streak Goldfinger Vírus* (BSGFV), *Banana Streak Obinol'Ewai Vírus* (BSOLV) e *Banana Streak Imovè Vírus* (BSIMV) (CHABANNES et al., 2013). Além disso, também foram desenvolvidos *primers* capazes de identificar genótipos contendo fragmentos infecciosos para as espécies BSGFV e BSOLV.

Na tentativa de aprimorar a técnica de indexação via IC-PCR, os pesquisadores do CIRAD incluíram o tratamento com DNase, no qual o uso da enzima auxilia na degradação de DNA's genômicos da planta, evitando, portando, resultados falso-positivos, denominando-a de IC-PCR+DNase (ISKRA- CARUANA, comunicação pessoal).

Essas abordagens metodológicas são potencialmente eficientes, pois permitem conhecer a diversidade de espécies de BSV, assim como identificar a presença de sequências virais ativas nos acessos avaliados, possibilitando o

uso da técnica de IC-PCR + DNase rotineira nos testes de indexação das espécies virais de BSV.

No Brasil, a infecção mista do BSV e CMV foi primeiramente relatada em 2000, onde o mesmo foi encontrado infectando mudas de bananeira da cv. Mysore, no estado de São Paulo (BRIOSO et al., 2000). Existem trabalhos demonstrando a ocorrência e diversidade de espécies de BSV em alguns estados do País (CARNELOSSI et al., 2014; ALVES, 2013; BRIOSO et al., 2011; SANT'ANA, 2013; FIGUEIREDO et al., 2006), inclusive com a identificação de possíveis novas espécies de BSV. Entretanto, esta é uma área ainda carente de informações, uma vez que os estudos abordam uma localidade, ou alguns estados, e não abrangem as principais áreas de plantio e não se sabe exatamente se as novas espécies de BSV identificadas até o momento, são realmente novas devido à falta de análises e informações mais refinadas (ALVES, 2013; BRIOSO et al., 2011; FIGUEIREDO et al., 2006).

Diante do que foi apresentado, esse trabalho se propõe a avaliar a incidência e prevalência das espécies de BSV nos acessos de bananeira mantidos no Banco de Germoplasma de banana da Embrapa; assim como analisar a distribuição das referidas espécies nos principais pólos de produção da fruta no Brasil, por meio da caracterização molecular e indexação a partir do uso da técnica IC-PCR+DNase, com a finalidade de identificar as espécies de BSV e mapear a presença de fragmentos infectivos no germoplasma comercial de banana brasileiro, visando contribuir com subsídios para a sustentabilidade do agronegócio da banana no País.

## REFERÊNCIAS

AGINDOTAN, B.O.; THOTTAPPILLY, G.; UWAIFO, A.; WINTER, S. Production of monoclonal and polyclonal antibodies against a Nigerian isolate of *Banana streak vírus*. **African Journal of Biotechnology**, v.2, n. 7, p. 171-178, 2003.

ALVES, P. C. M. S. **Detecção e caracterização molecular de isolados de Banana Streak Vírus (BSV) no Brasil**. Dissertação (Biotecnologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras. Lavras - Minas Gerais, p. 74, 2013.

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

BRIOSO, P.S.T.; CORDEIRO, Z.J.M.; REZENDE, J.A.M.; KITAJIMA, E.W.; PIMENTEL, J.P.; FIGUEIREDO, A.R. Infecção mista em bananeiras pelos vírus do mosaico do pepino ("*Cucumber Mosaic Vírus*", CMV) e da risca da bananeira ("*Banana Streak Vírus*", BSV) no Brasil. **Summa Phytopathologica**, v.26, n.2, p. 254-257, 2000.

CARNELOSSI, P.; BIJORA, T.; FACCO, C. U.; SILVA, J. M.; PICOLI, M. H. S.; SOUTO, E. R.; OLIVEIRA, F. T. Epissomal detection of *Banana Streak OL vírus* in single and mixed infection with *Cucumber mosaic vírus* in banana 'Nanicão Jangada'. **Tropical Plant Pathology**, v.39, n.4, p.342-346, 2014.

CHABANNES, M.; BAURENS, F. C.; DUROY, P. O.; BOCS, S.; VERNEREY, M. S.; GOUD, M. R.; BARBE, V.; GAYRAL, P.; ISKRA-CARUANA, M. L. Three infectious viral species lying in wait in the Banana Genome. **Journal of Virology**, v.87, p.862-863, 2013.

CORDEIRO, Z.J.M.; MATOS, A.P.; HADDAD, F. Doenças fúngicas e bacterianas. In: In: FERREIRA, C.F. et al (Org.) **O agronegócio da banana**. Brasília, DF: Embrapa, 2016. p. 545-575. 2016.

CORDEIRO, Z.J.M.; MEISSNER FILHO, P.E.; RITZINGER, C.H.S.P.; MATOS, A.P. **Sistema de produção de banana para o estado do Pará**. Sistema de Produção Embrapa, 2ª edição, 2014. Disponível em: <https://www.spo.cnptia.embrapa.br/conteudo>. Acesso em setembro de 2018.

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

DONATO, S. L. R. Avaliação de variedades e híbridos de bananeira sob irrigação. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 25, n. 2, p. 348-351. Jaboticabal, São Paulo, 2003.

FAOSTAT- Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO).Database (2018). United States: FAO/FAOSTAT. Acesso: 18 de dezembro de 2018.

FIGUEIREDO, D. V.; MEISSNER FILHO, P. E.; SILVA NETO, S. P.; BRIOSO, P. S. T. Detection and analysis of Banana streak vírus (BSV) sequences variability of banana from Brazil. **Summa Phytopathologica**, v.32, n. p. 118-123, 2006.

GEERING, A. D.; OLSZEWSKI, N. E.; DAHAL, G.; THOMAS, J. E.; LOCKHART, B. E. L. Analysis of the distribution and structure of integrated Banana streak vírus DNA in a range of Musa cultivars. **Molecular Plant Pathology**, v. 2, n. 4, p. 207-213, 2001.

GEERING, A. D. W.; McMICHAEL, L. A.; DIETZGEN, R. G.; THOMAS, J. E. Genetic diversity among *Banana streak vírus* isolates from Australia. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 90, n. 8, p. 921-927, 2000.

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

HARPER, G.; HILL, R. Cloning and sequence analysis of banana streak vírus DNA. **Vírus Genes**, v.17, n., p. 271-278, 1998.

HARPER, G.; DAHAL, G.; THOTTAPPILLY, G.; HULL, R. Detection of episomal Banana Streak Badnavírus by IC-PCR. **Journal of Virological Methods**, v.79, n1, p.1-8,1999.

HARPER, G.; HART, D.; MOULT, S.; HULL, R.; GEERING, A.; THOMAS, J. The diversity of Banana Streak Vírus isolates in Uganda. **Archives of Virology**, v. 150, p. 2407-2420. 2005.

IBGE. **Sistema de Recuperação Automática** (2018). em: <https://sidra.ibge.gov.br/tabela/1618#resultado>. Acesso em: 18/12/2018.

ISKRA-CARUANA M. L.; CHABANNES M.; DUROY, P. O.; MULLER, E.A possible scenario for the evolution of Banana Streak Vírus in banana. **Vírus Research**, v. 186, p. 155-162, 2014.

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

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

JONES, D.R. Introduction to banana, abaca and Enset. In: Jones DR (ed) **Diseases of Banana, Abaca and Enset**. CABI Publications, Oxon, United Kingdom, p.1-36, 2000.

KIMATI, H.; GALLI, F. Doenças da bananeira *Musa* spp. In: GALLI, F. Manual de Fitopatologia. Doenças das plantas cultivadas. São Paulo: **Agronômica Ceres**, v. 2. p. 87-101, 1980.

LHEUREUX, F; CARREEL, F.; JENNY, C.; LOCKHART, B.; ISKRA-CARUANA, M. Molecular characterization of *Banana streak acuminata* Vietnam vírus isolated from *Musa acuminata* siamea (banana cultivar). **Archives of Virology**, v. 152, p. 1409-1416, 2007.

Le PROVOST, G.; ISKRA-CARUANA, M. L.; ACINA, I.; TEYCHENEY, P. Y. Improved detection of episomal Banana streak viroses by multiplex immunocapture PCR. **Journal Virology Methods**, v. 137, p. 7-13, 2006.

NOUMBISSIE-TOUKO, G.B. **Ségrégation de schromosomes dans um croisement interspécifique de bananiers (AAAB x AA) et redistribution des sequences du Banana streak vírus intégrées au génome B**. Tese (Biologie Intégrativedes Plantes (BIP). Centre International d'Études Supérieures en Sciences Agronomiques de Montpellier. França, 2014.

PLOETZ, R.C. Panama disease, An old nemesis rears its ugly head: part 1. The beginnings of the banana export trades. Online. **Plant Health Progress**, 2005. DOI: 10.1094/PHP-2005-1221-01-RV.

REAGIN, M.J.; GIESLER, T.L.; MERLA, A.L.; RESETAR-GERKE, J.M.; KAPOLKA, K.M.; MAMONE, J.A. TempliPhi: a sequencing template preparation procedure that eliminates *overnight* cultures and DNA purification. **Journal of Biomolecular Techniques**, v.14, n.2, p.143-148, 2003.

RIBEIRO, L. R.; OLIVEIRA, L. M.; SILVA, S. O. E.; BORGES, A. L. Avaliação de cultivares de bananeira em sistema de cultivo convencional e orgânico. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 35, n. 2, p. 508-517. Jaboticabal – São Paulo, 2013.

SANT'ANA, M. M. **Ocorrência do Banana Streak vírus (BSV) e do Cucumber Mosaic Vírus (CMV) em cultivo convencional e orgânico de bananeiras (*Musa spp.*) no Vale do Ribeira.** p. 83. Dissertação (Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio). Instituto Biológico, da Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios. São Paulo, 2013.

SEYDOU, T.; ELISÉE, A.L.D.G.; MAMADOU, C.; LEONARD, O.S; FERNAND, K.; GASTON, K.K.;BRAHIMA, C.; DAOUDA, K. Agronomic Performance of Plantain Cultivars (***Musa spp.***) in Efficient Mixing Situation for the Control of Black Sigatoka in Southern Côte d'Ivoire. **Asian Journal of Plant Pathology**, v.11, n. 1, p.1-9, 2017.

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

ZHANG, T. et al. Establishing RNA vírus resistance in plants by harnessing CRISPR immune system. **Plant Biotechnology Journal**, v.16, p.1415-1423. 2018.

**Detecção e caracterização molecular de espécies do Vírus das Estrias da Bananeira (BSV) em acessos da coleção de germoplasma de bananeira da Embrapa**



## **Detecção e caracterização molecular de espécies do Vírus das Estrias da Bananeira (BSV) em acessos da coleção de germoplasma de bananeira da Embrapa**

**Resumo.** As bananeiras e os plátanos pertencem ao gênero *Musa* spp. e apresentam notável importância comercial, no entanto, a produtividade pode ser limitada por fatores abióticos e bióticos. Dentre os fatores bióticos, as viroses mais comuns encontradas em bananeira são o mosaico da bananeira e as estrias da bananeira. O presente estudo teve como objetivo identificar e caracterizar, por meio de método molecular, as espécies do vírus das estrias da bananeira (BSV) em acessos da coleção de germoplasma de bananeira da Embrapa. Para tanto, foram coletadas 300 amostras analisadas a partir do uso de 16 *primers* espécie-específicos capazes de detectar a presença das seguintes espécies de BSV endógeno: *Goldfinger* (eBSGFV), *Imovè* (eBSIMV) e *Obinol'Ewai* (eBSOLV). A indexação das amostras foi realizada por IC-PCR + DNase, sendo utilizadas amostras de folhas de 138 acessos da coleção de germoplasma provenientes do cultivo *ex situ* e 39 amostras do cultivo *in vitro*. A análise dos 300 acessos permitiu observar que 162 apresentaram resultados negativos quanto à presença de eBSV. Dos acessos com resultado positivo 127 apresentaram integrações mistas, dez apresentaram integrações virais da espécie BSOLV e um acesso da espécie viral BSGFV integrada no seu genoma. Nenhum acesso possui apenas a espécie BSIMV integrada no genoma. O tipo de integração mista mais comum foi para as espécies BSGFV e BSOLV, presentes em 76 amostras, sendo a maioria desses acessos do agrupamento genômico AAAB e AAB. Também foi identificada a presença das três espécies virais de eBSV em um total de 42 amostras, sendo que dos oito diploides com genoma B estudados, sete apresentaram a presença das três espécies virais inseridas no mesmo genoma. Das 138 amostras de bananeira positivas para as espécies de eBSV, 19 apresentaram infecção por BSV epissomal, das quais treze possuem a espécie viral BSOLV e sete a presença da espécie viral BSGFV. Das amostras do cultivo *in vitro*, nenhuma amostra analisada apresentou a BSV epissomal para as espécies BSGFV e BSIMV. Os acessos com o genoma B da coleção de germoplasma da Embrapa possuem a presença de ao menos uma das três espécies virais inseridos no genoma da bananeira na forma endógena. Os acessos de bananeira da coleção de germoplasma da Embrapa tem baixa frequência de BSV epissomal.

**Palavras-chave:** BSVepissomal, eBSV, BSOLV, BSGFV, BSIMV.

## **Detection and molecular characterization of Banana Streak Virus (BSV) species in accessions of the banana germplasm collection at Embrapa**

**Abstract.** Bananas and plantains belong to the genus *Musa* spp. and are very important commercially, however, productivity may be limited by abiotic and biotic factors. Among the biotic factors, the main viral diseases are banana mosaic and banana leaf streak virus (BSV). The objective of this study was to identify and characterize the species of BSV in accessions of the Banana Germplasm Collection at Embrapa (Brazil) by molecular methods. Three-hundred samples were collected and analyzed using 16 species-specific primers capable of detecting the presence of the following species of endogenous BSV: *Goldfinger* (eBSGFV), *Imové* (eBSIMV) and *Obino'EWai* (eBSOLV). Indexation of the samples was carried out by IC-PCR + DNase, whereas leaf samples of 138 *ex situ* accessions of the germplasm collection and 39 from *in vitro*, were analyzed. Analysis of the 300 accessions showed that 162 samples were negative for eBSV presence. Of the positive accessions, 127 presented mixed integrations, ten for BSOLV and one accession with BSGFV integrated in its genome. No accession had only BSIMV integrated in its genome. The most frequent mixed integration was for species BSGFV and BSOLV, present in 76 samples whereas most of the accessions belong to the AAAB and AAB genome group. Integration by the three species of BSV in 42 samples was also checked whereas from the eight diploids with the BB genome, seven had mixed integration with all three species inserted in the genome. Of the 138 positive banana samples for eBSV, 19 were episomal, thirteen were the BSOLV viral species and seven were the BSGFV viral species. None of the *in vitro* samples contained the episomal form of BSGFV and BSIMV species. The accessions with the BB genome from the Embrapa germplasm collection had at least one of the three species inserted in the banana genome (eBSV). The banana accessions from the Embrapa germplasm collection have low frequency of episomal BSV.

**Key-words:** episomal BSV, eBSV, BSOLV, BSGFV, BSIMV.

## 1. INTRODUÇÃO

As bananeiras e os plátanos pertencem ao gênero *Musa* spp. e apresentam notável importância comercial e nutricional. Por seu valor nutritivo, é considerada a quarta cultura mais importante do mundo, em conjunto com o arroz, o trigo e o milho (MANZO-SÁNCHEZ et al., 2015). Em território brasileiro, trata-se da segunda fruta mais cultivada e consumida. Em muitos países, a banana, além de ser um alimento complementar da dieta da população, apresenta grande relevância social e econômica, gerando empregos e servindo como fonte de renda para pequenos agricultores (RIBEIRO et al., 2013).

Em 2018 a produção mundial de banana foi de 113 milhões de toneladas, numa área de aproximadamente 5,5 milhões de hectares. O Brasil ocupa o quarto lugar no ranking mundial de produção de banana, produzindo aproximadamente 7 milhões de toneladas (FAOSTAT, 2018). As principais regiões brasileiras produtoras de banana são o Nordeste e o Sudeste, com produção estimada em mais de 2 milhões de toneladas. Os maiores volumes são colhidos nos estados de São Paulo, Bahia e Minas Gerais.

No Brasil, o clima favorável possibilita a produção de banana em todo território. Dentre as cultivares de bananeira mais plantadas, com comercialização voltada para o mercado nacional, destacam-se os triploides dos subgrupos Prata (Prata-Anã, Prata Catarina, Prata Gorutuba e Pacovan), Terra (D'Ángola e Terra Maranhão), Maçã e Cavendish (AMARO e FAGUNDES, 2016).

Diversos fitopatógenos comprometem à produção da banana, tais como fungos, nematoides e vírus, afetando a produtividade e a qualidade dos frutos (BRIOSO et al., 2000). Entre as viroses mais comuns, destacam-se: o Vírus do Mosaico do Pepino (CMV) e o Vírus das Estrias da Bananeira (BSV) (ISKRA-CARUANA, et al., 2010). Outros vírus, como o Topo em Leque da Bananeira (*Banana Bunchy Top Virus*, BBTV), que é a principal virose da cultura no mundo, não foi relatado no Brasil até 2019.

O BSV pertence à família *Caulimoviridae*, gênero, *Badnavirus*. O BSV possui sequências denominadas de sequências endógenas de pararetrovírus (*Endogenous Pararetroviral Sequences* - EPRVs) ou simplesmente sequências

endógenas de BSV (eBSV) (METTE et al., 2002; STAGINNUS et al., 2009). Dois tipos de sequências de integradas são encontrados associados à *Musa* spp. O primeiro tipo, compreende sequências incompletas do genoma do vírus, sendo incapazes de causar doença. O outro tipo corresponde a sequências endógenas ativas contendo genoma completo do BSV (GEERING et al., 2001, 2005a; JAMES et al., 2011a). Esse fenômeno de ativação do vírus ocorre devido a estresses bióticos e ou abióticos, o que pode levar ao aparecimento da doença (DALLOT et al., 2001; CÔTE et al., 2010).

Estudos indicam que diploides e híbridos interespecíficos envolvendo os genomas A e B são provenientes do mesmo ancestral de *Musa balbisiana*, que carrega as eBSVs. Desta forma, supõe-se que as eBSVs tiveram um papel ativo na diversidade e evolução do BSV epissômico. Isso provavelmente reflete a contribuição exclusiva de eBSV à população viral atual para as três principais espécies de BSV (BSOLV, BSGFV e BSIMV) (CHABANNES et al., 2013; ISKRA-CARUANA et al., 2010).

A técnica mais indicada para o diagnóstico de BSV em mudas de bananeira utilizando PCR é a Amplificação por Círculo Rolante (RCA) (DEAN et al., 2001; REAGIN et al., 2003), com modificações acrescentadas por JAMES et al. (2011a). No entanto, métodos aplicados para diagnose do BSV, como PCR e sorológicos, muitas vezes apresentam limitações. Os métodos sorológicos, em sua maioria, não são capazes de distinguir as espécies virais, devido a heterogeneidade sorológica, podendo gerar resultados falso-negativos. Já os métodos moleculares, sem uso de *primers* espécie-específicos, podem detectar sequências endógenas disfuncionais, gerando resultados falso-positivos. Além disso, são técnicas morosas e de elevado custo (FIGUEIREDO et al., 2006; ALVES, 2013).

A técnica de indexação desenvolvida pelo Centro de Cooperação Internacional em Pesquisa Agrônoma para o Desenvolvimento (CIRAD, Montpellier, França), se baseia na imunocaptura associada com a reação em cadeia de polimerase (IC-PCR + DNase), no qual o uso da enzima DNase auxilia na degradação de DNAs genômicos da planta, evitando assim, resultados falso-positivos. Para tal, essa técnica utiliza três classes de *primers* espécie-específicos capazes de identificar as integrações virais e diferenciar as

principais espécies do vírus das estrias da bananeira (BSV) comumente encontradas no genoma de bananeira: *Banana Streak Goldfinger Vírus* (BSGFV), *Banana Streak Obinol'Ewai Vírus* (BSOLV) e *Banana Streak Imovè Vírus* (BSIMV) (CHABANNES et al., 2013).

Além do desafio da identificação de vírus epissomal em mudas de bananeira, principalmente nas que possuem o genoma B, pouco ainda se sabe a respeito da diversidade de espécies de BSV no Brasil, devido à sua alta diversidade e complexidade genética, necessitando de mais estudos nessa área (ALVES, 2013; BRIOSO et al., 2011; FIGUEIREDO et al., 2006).

A utilização de cultivares livres do vírus BSV endógeno no genoma B de *Musa* spp. é de suma importância para o agronegócio brasileiro da bananicultura, processo que pode ser atendido por meio do melhoramento genético baseado em cruzamentos e seleção nas progênes livres de sequencias completas do vírus (SILVA et al., 2013). Além do mais, o fato da maioria das cultivares usadas no país possuir o genoma B em sua composição, o monitoramento do aparecimento da doença no campo também se torna uma atividade imprescindível. Nesse sentido, o presente estudo teve como objetivo identificar espécies do vírus das estrias da bananeira (BSV) prevalentes em acessos do germoplasma de bananeira da Embrapa.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1. Material vegetal e extração de DNA**

Foram coletadas 300 amostras de folhas jovens de bananeiras pertencentes ao Banco de Germoplasma de Bananada Embrapa (12°40'19" latitude sul, 39°06'23" de longitude oeste, 226 m acima do nível do mar) (Tabela suplementar 1). Cada amostra corresponde a um acesso.

O DNA das amostras foi extraído segundo protocolo CTAB (brometo de cetiltrimetilamônio) descrito por Doyle e Doyle (1990). A qualidade e quantidade de DNA extraído foi avaliada por quantificação em gel de agarose 1% (p/v) (Invitrogen) corado com brometo de etídio (1,0 mgL<sup>-1</sup>) por comparação visual de diversas concentrações de DNA do fago Lambda (Invitrogen). A eletroforese

foi realizada em tampão TBE 0,5X (45 mM Tris-borate, 1 mM EDTA e q.s.p de água destilada), os géis foram visualizados em Luz UV e registradas com o fotodocumentador Gel Logic 212 Pro (Carestream Molecular Imaging).

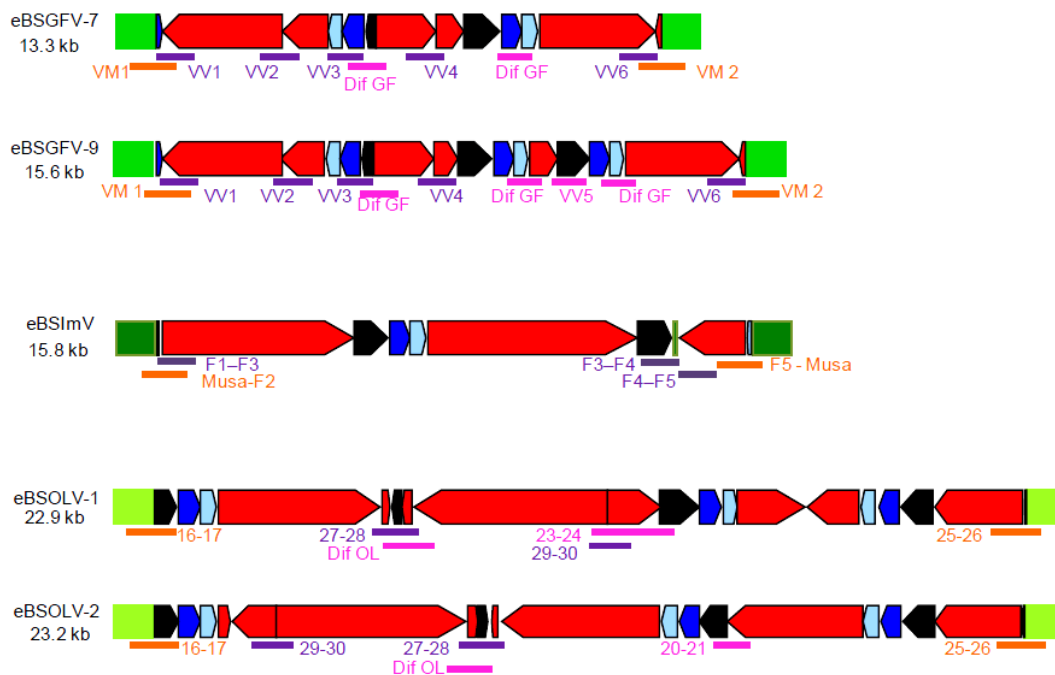
## **2.2. Descrição dos primers espécie-específicos**

Para a análise de incidência e prevalência do vírus das estrias da bananeira, 16 *primers* espécie-específicos divididos em duas categorias referentes à região de acesso no genoma viral e ou vegetal, foram utilizados: (1) iniciadores de junção (que acessam a região de junção entre o genoma viral e o de *Musa* spp.); (2) iniciadores internos ou estruturais, que acessam apenas o genoma viral integrado na planta (Figura 1 e Tabela suplementar 2).

## **2.3. PCR multiplex**

Como sequências endógenas do BSV (eBSVs) são frequentemente encontradas no genoma de *Musa* spp., foi realizado, inicialmente, um PCR multiplex com as 300 amostras foliares para identificar apenas as sequências genômicas das espécies virais do BSV endógeno nas amostras coletadas. Neste caso, foi utilizando o *primer* 25S da região conservada do DNA de bananeira.

As reações de amplificação foram completadas para volume final de 15µL, contendo: Tampão 5X (Promega), dNTPs 0,2 mM, 0,2 µM de cada iniciador espécie-específico (IDT), e 0,2 µM do iniciador 25S, 30 ng de DNA genômico e uma 1U/µl de Taq DNA polimerase GoTaq (Promega). As amplificações foram conduzidas em termociclador Applied Biosystems (ABI), Veriti 96-well Thermal Cycler, utilizando temperatura de anelamento determinada para cada *primer* específico (Tabela Suplementar 1) (CHABANNES et al., 2013; GAYRAL e ISKRA-CARUANA, 2009; GEERING et al., 2005).



**Figura 1.** Representação do genoma de três espécies do vírus das estrias da bananeira e delimitação dos diferentes *primers* espécie-específicos para BSGFV, BSIMV e BSOLV, respectivamente. Os pentágonos nas cores azul escuro, azul claro e vermelho, representam as ORFs 1, 2 e 3 no genoma viral. O retângulo verde representa o genoma da bananeira. Os traços na cor laranja representam os *primers* de junção; os *primers* internos/estruturais estão representados pela cor roxa. Os *primers* alélicos estão representados pela cor lilás. Em preto estão representadas as regiões intergênicas. Fonte: NOUMBISSIE-TOUKO (2014).

A condição de amplificação incluiu um ciclo de desnaturação de 5 min. a 94 °C, seguido de 30 ciclos de desnaturação de 30 segundos a 94 °C, 30 segundos, com temperatura de anelamento (*Ta*) específica de cada *primer*, 45 segundos de extensão a 72 °C, com uma extensão final de 10 min. a 72 °C e 14 °C ∞.

Os produtos da amplificação foram separados em gel de agarose 2% a 100 V, em tampão TBE 0,5X e corados em brometo de etídio (0,5 µl mL<sup>-1</sup>). Os fragmentos amplificados foram fotografados utilizando fotodocumentador Gel Logic 2200 Pro. Os tamanhos dos fragmentos foram determinados baseados em padrão molecular de 100 pb (DNA Ladder Biolabs).

## 2.4. Indexação por IC-PCR + DNase

### 2.4.1. Material Vegetal

A partir do PCR multiplex foram selecionados um total de 138 acessos que apresentaram resultados positivos para presença do BSV endógeno (eBSV). Amostras foliares destes 138 acessos provenientes do cultivo *ex situ* da coleção de germoplasma da Embrapa foram portanto coletadas, assim como 39 amostras do cultivo *in vitro*, sendo neste caso selecionadas apenas amostras de plátanos, híbridos comerciais e diploides BBs, importantes para o programa de melhoramento genético de banana da Embrapa. Todas as amostras foram envolvidas em papel alumínio, identificadas e mantidas refrigeradas até o momento da extração do DNA, realizada de acordo com o método descrito no item 2.1.

A imunocaptura foi realizada utilizando anticorpo policlonais (NDOWORA e LOCKHART, 2000), cedido pelo CIRAD. Para tanto, 25 µl do anticorpo policlonal do BSV na diluição 1:6000 em tampão carbonato (15mM de carbonato de sódio, 34mM de bicarbonato de sódio, pH 9,6) foi depositado em microtubos de 2mL e deixados overnight a 4°C. As lavagens dos microtubos foram efetuadas duas vezes com 100uL de tampão PBS-Tween (135mM NaCl, 1,4mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2,6mM KCl, 8mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,05% Tween20, pH 7,4) e uma vez com 100uL de água ultra pura.

Os extratos foliares foram pesados (0,5g) e colocados em sacos plásticos sendo processados em um macerador adaptado a furadeira na presença de 5mL do tampão de maceração (2% PVP40, 0,2% de sulfito de sódio e 0,2% de BSA, preparado em PBS-T). 1mL deste extrato foi transferido para microtubos e centrifugados a 3000g/3minutos, em temperatura ambiente. Aliquotas de 25uL do sobrenadante foram adicionadas aos microtubos cobertos com o anticorpo e incubados na temperatura ambiente por 3 horas. Novamente os microtubos foram lavados duas vezes com PBS-T e uma vez com água ultra pura e então levemente secos. Em seguida foi adicionado o mix da DNase (3 µl do tampão da enzima, 3 µl da DNase, 24 µl água) e incubados a 37°C por 45 minutos. Após incubação foi feita a PCR diretamente nos microtubos, como



descrito no item 2.3. Foram utilizados os *primers* espécie-específicos para BSOLV, BSGFV e BSIMV, descritos anteriormente no item 2.2.

Os produtos da amplificação foram separados em gel de agarose 2% a 100 V, em tampão TBE 0,5X e corados em brometo de etídio ( $0,5 \mu\text{l mL}^{-1}$ ). Os fragmentos amplificados foram fotografados utilizando fotodocumentador Gel Logic 2200 Pro. Os tamanhos dos fragmentos foram determinados baseados em padrão molecular de 100pb (DNA Ladder Biolabs).

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

#### 3.1. Detecção de espécies de eBSV por meio de PCR multiplex

Dos 300 acessos analisados por PCR multiplex, utilizando *primers* espécie-específicos e 25S (região conservada do DNA da bananeira), 162 apresentaram resultados negativos quanto à presença de eBSV para as três espécies virais avaliadas (BSGFV, BSOLV e BSIMV), o que corresponde a 54% do germoplasma de *Musa* spp. mantido pela Embrapa (Tabela 1). Todos esses acessos possuem apenas o genoma A na sua constituição, sendo que cinco destes correspondem às espécies *Musa coccinea* (Andrews), *M. ornata* (Roxb.), híbrido entre *M. ornata* x *M. velutina* (H. Wendl. & Drude), *M. laterita* (Cheesman) e a cultivar Bronze.

A presença das três espécies de BSV de forma isolada ou mistas foi observada em 46% do germoplasma da Embrapa, correspondendo a 138 acessos, os quais são híbridos entre *M. balbisiana* e *M. acuminata* ou diploides selvagens com genoma BB (Tabela 1 e Figura 2). Destes, 127 acessos apresentaram integrações mistas para as três espécies virais, enquanto dez apresentaram apenas para BSOLV e um outro acesso para BSGFV. Não foi observada a presença da espécie viral BSIMV endógena de forma isolada em nenhum acesso.

O tipo de integração mista mais comum ocorreu entre BSGFV + BSOLV, correspondendo a 76 acessos predominantemente tetraploides, com genoma AAAB e triploides AAB. Um acesso apresentou BSGFV + BSIMV, e infecções mistas com as três espécies ocorreram em 42 genótipos.

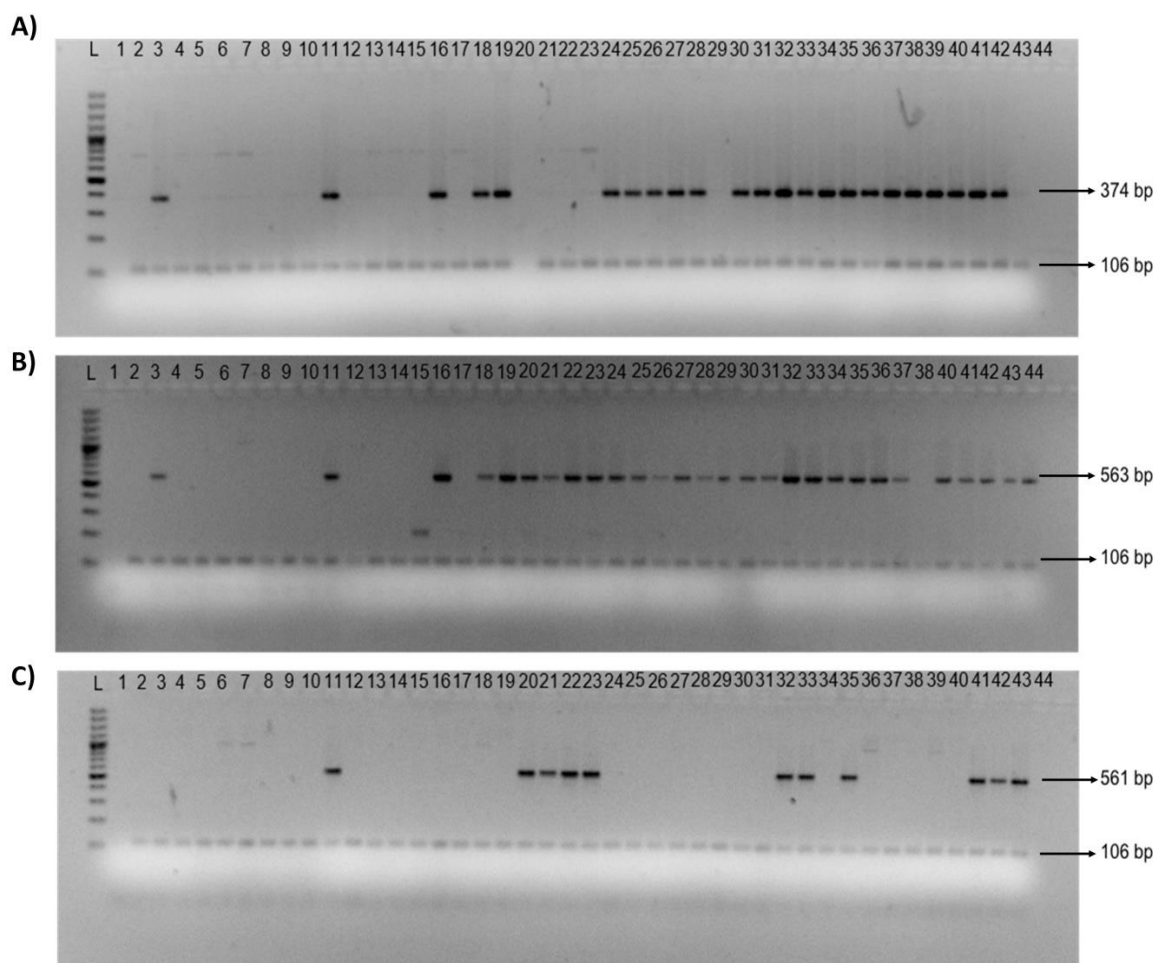
As análises demonstraram portanto que, ao menos uma espécie de BSV apresenta-se integrada ao genoma dos acessos com a presença do genoma B, especificamente *Banana Streak Obinol'Ewai Vírus* (BSOLV), *Banana Streak Goldfinger Vírus* (BSGFV) ou *Banana Streak Imovè Vírus* (BSIMV), sendo o BSOLV o vírus prevalecente no Banco de Germoplasma da Embrapa.

**Tabela 1.** Integrações virais de espécies do vírus das estrias da bananeira (BSV) em acessos da coleção de germoplasma de bananeira da Embrapa. Embrapa 2019.

Acessos	Número de amostras (%)	Integrações isoladas com BSV			Integrações mistas com BSV				Total
		BSGFV	BSOLV	BSIMV	BSGFV+ BSOLV	BSGFV+ BSIMV	BSOLV+ BSIMV	BSGFV+ BSOLV+ BSIMV	
AA	90 (30,00)	0	0	0	0	0	0	0	0
AAA	61(20,33)	0	0	0	0	0	0	0	0
AAAA	6(2,00)	0	0	0	0	0	0	0	0
AAAB	41(13,67)	0	2	0	29	0	7	3	41
AAB	63(21,00)	1	8	0	40	1	1	12	63
AABB	2 (0,67)	0	0	0	0	0	0	2	2
AB	2(0,67)	0	0	0	1	0	0	1	2
ABB	21(7,00)	0	0	0	4	0	0	17	21
ABBB	1(0,33)	0	0	0	1	0	0	0	1
BB	8 (2,67)	0	0	0	1	0	0	7	8
SE	5 (1,66)	0	0	0	0	0	0	0	0
Total	300(100,00)	1(0,72)	10(7,3)	0	76(55)	1(0,72)	8(5,8)	42(30,4)	138

\*SE= subespécies de *Musa* spp. BSGFV: *Banana Streak Goldfinger Vírus*, BSOLV: *Banana Streak Obinol'Ewai Vírus*, BSIMV: *Banana Streak Imovè Vírus*.

De acordo com ISKRA-CARUANA et al. (2014) a integração viral do BSV em bananeira ocorreu a partir de um processo de co-evolução entre o vírus e a espécie selvagem *M. balbisiana*, detentora do genoma B. Após as primeiras infecções virais ocorreram eventos sucessivos de integração do vírus no genoma das bananeiras selvagens, conferindo resistência ao vírus em *M. balbisiana*. No decorrer do processo evolutivo, essas sequências virais tornaram-se parte do genoma B das plantas, fixando-se na população pela ação da seleção natural e ou deriva genética (GAYRAL et al., 2008). Da mesma forma, é provável que a seleção humana de híbridos interespecíficos contendo o genoma B tenha ajudado na manutenção da atividade viral endógena, que por fim resultou em alguns surtos globais de BSV nos últimos 20 anos (ISKRA-CARUANA et al., 2014).



**Figura 2.** Perfil eletroforético de alguns acessos com diferentes ploidias da coleção de germoplasma de bananeira da Embrapa analisados com *primers* espécie-específicos de BSV e primer 25S (região conservada do DNA de bananeira) = 106pb. Gel A: *Banana Streak Goldfinger Virus* (BSGFV) = 374pb, Gel B: *Banana Streak Obinol'Ewai Virus* (BSOLV) = 563pb e Gel C: *Banana Streak Imovê Virus* (BSIMV) = 561pb. (L) = marcador de 100pb, (1) = controle da reação com água, (2) = controle negativo, (3) = controle positivo. De 4 – 15 acessos com ploidias AA, AAA e AAAA, com exceção da amostra 11 que possui ploidia AAB; Do 16 – 23: Acessos com ploidia AAAB; Do 24 – 31: Acessos com ploidia AAB; 32 e 33: acessos com ploidia AABB; 34 e 35: Acessos com ploidia AB; 36 – 39: Acessos com ploidia ABB; 40: acesso com ploidia ABBB; 41– 43: Acessos com ploidia BB. Embrapa 2019.

Dessa forma, nossos resultados corroboram com os descritos por GEERING et al. (2001), Le PROVOST et al. (2006), GAYRAL et al. (2008), CHABANNES et al. (2013) e ISKRA-CARUANA et al. (2014), de que sequências endógenas do BSV capazes de causar infecção na planta são encontradas apenas em espécies de bananeira que apresentam o genoma B. Ainda, segundo os autores, dentre as integrações virais comumente

encontradas em plantas com genoma B merecem destaque as espécies BSOLV, BSGFV e BSIMV.

Conforme descrito anteriormente, todos os acessos com genoma A analisados não apresentaram sequências de BSV endógenas para as três espécies virais testadas, resultado esperado uma vez que poucas espécies de BSV, a exemplo de alguns isolados do *Banana Streak Acuminata Vírus* (BSAcV) e *Banana Streak Cavendish Vírus* (BSV-Cav) são restritos a *M. acuminata*. Além disso, estas espécies de vírus comumente apresentam sequências virais não ativas no genoma A das plantas de bananeira (REMANS et al., 2005; LHEUREUX et al., 2007; GAYRAL e ISKRA-CARUANA, 2009). Em contraponto, JAVER-HIGGINSON et al. (2014) demonstrou por imunocaptura-PCR-multiplex, que embora o *Banana Streak Mysore Vírus* (BSMysV) seja o vírus prevalecente em genótipos de *M. acuminata* em Cuba, as espécies BSOLV, BSGFV e BSIMV também se encontram presentes em baixa incidência em *M. acuminata*.

### **3.2. Indexação dos acessos positivos para espécies de BSV por meio de IC-PCR+ DNase**

Dos 138 acessos indexados, dezenove apresentaram infecção por BSV epissomal, sendo treze da espécie BSOLV e seis da espécie BSGFV. Não houve acessos com a presença de mais de uma espécie viral de BSV epissomal para o mesmo acesso. Importante salientar que a maioria dos acessos infectados com o vírus BSV são do subgrupo Prata (Tabela suplementar 3).

Dentre os dezenove acessos positivos, estão algumas importantes cultivares comerciais, tais como a BRS Platina, BRS Pacovan Ken e Prata Gorutuba, todas com a presença do BSGFV; e Terra Maranhão com BSOLV, sendo este plátano bastante cultivado principalmente no Estado da Bahia. Nenhum acesso com genoma BB, das oito amostras avaliadas, apresentou BSV epissomal no seu DNA (Tabelas 2 e 3).

**Tabela 2.** Indexação por meio da técnica IC-PCR+ DNase para presença das diferentes espécies virais de BSV epissomal em acessos da coleção de germoplasma de bananeira da Embrapa. Embrapa 2019.

<b>Amostras infectadas por BSV</b>				
<b>Ploidia</b>	<b>Nº de amostras</b>	<b>BSOLV</b>	<b>BSGFV</b>	<b>BSIMV</b>
AAAB	41	7	3	0
AAB	63	6	3	0
AABB	2	0	0	0
AB	2	0	0	0
ABB	21	0	0	0
ABBB	1	0	0	0
BB	8	0	0	0
<b>Total</b>	<b>138</b>	<b>13</b>	<b>6</b>	<b>0</b>

BSGFV: *Banana Streak Goldfinger Vírus*, BSOLV: *Banana Streak Obinol'Ewai Vírus*, BSIMV: *Banana Streak Imovè Vírus*.

A existência do genoma completo do BSV inserido no genoma nuclear de bananeiras com genoma B foi comprovada por PLOETZ et al. (2003). Além disso, as EPRVs associadas ao genoma B são capazes de se recombinar levando a uma forma infectiva do vírus (JAKOWITSCH et al., 1999).

A presença de EPRVs no genoma de plantas de bananeiras dificulta a detecção de BSV epissomal por PCR convencional, uma vez que não pode distinguir entre o DNA da planta e do vírus epissomal, levando a identificação de falsos positivos. No entanto, a técnica de imunocaptura por PCR (IC-PCR + DNase) empregada neste trabalho apresentou resultados confiáveis e precisos, possibilitando identificar as espécies de BSV epissomal presente nos acessos analisados.

Estudo realizado anteriormente, com 220 acessos do Banco de Germoplasma de banana da Embrapa, por meio de métodos biológicos (inoculação e aquisição por meio da cochonilha vetora *Planococcus citri* Risso), observou que 44 acessos apresentaram o vírus BSV (SILVEIRA et al., 2008). Esses dados são inferiores aos resultados observados em nosso trabalho, muito em face das limitações apresentadas pelas técnicas sorológicas na época. Além disso, nessas análises não foi possível identificar quais acessos possuíam sequências epissomais do BSV.

**Tabela 3.** Acessos da coleção de germoplasma de bananeira da Embrapa com resultado positivo para BSV epissomal obtido a partir da técnica IC-PCR+DNase. Embrapa 2019.

Acessos	Ploidia	Tipo	IC PCR+DNase		
			OL	GF	IM
ST12-31	AAAB	Prata	+	-	-
BRS Pacovan Ken*	AAAB	Prata	-	+	-
BRS Platina*	AAAB	Prata	-	+	-
YB 42-47	AAAB	Maçã	+	-	-
Azedinha	AAAB	-	-	+	-
YB 42-08	AAAB	Maçã	+	-	-
Pisang Langka	AAAB	-	+	-	-
Platina IAC	AAAB	Prata	+	-	-
ITC 505	AAAB	-	+	-	-
Prata Maçã	AAAB	Prata	+	-	-
Terra Maranhão**	AAB	Plátano	+	-	-
Terrinha**	AAB	Plátano	-	-	-
Samura B	AAB	Plátano	+	-	-
Mysore	AAB	Mysore	+	-	-
Pulut	AAB	-	+	-	-
tugoomomboo	AAB	-	+	-	-
Prata Pacovan	AAB	Prata	+	-	-
Prata Gorutuba***	AAB	Prata	-	+	-
Enxerto 33	AAB	Prata	-	+	-
SimiliRadjah	AAB	-	-	+	-

OL= *Banana Streak Obinol'Ewai Vírus* (primer BSOLV), GF= *Banana Streak Goldfinger Vírus* (primer BSGFV), e IM=*Banana Streak Imovè Vírus* (primer BSIMV). \* Híbridos comerciais, \*\* Cultivares comerciais de plátanos, \*\*\* Cultivar comercial do subgrupo Prata.

Importante ressaltar que apesar dos dezenove acessos com genoma B terem apresentado resultado positivo para as espécies virais BSOLV ou BSGFV, não significa que esses genótipos apresentarão a doença, uma vez que é necessário exposição à estresses bióticos e ou abióticos para ativar as sequencias virais. Além disso, observações visuais dos genótipos com genoma B, distribuídos aleatoriamente no banco de germoplasma, confirmam os resultados da indexação, considerando que sintomas aparentes de BSV não foram observados nas plantas analisadas. Muito provavelmente os baixos

índices de BSV episomal se devem, em parte, a uma provável ausência de fragmentos infecciosos do BSV no genoma destes acessos que apresentaram resultado positivo na indexação e também, pela baixa incidência de cochonilhas na área. De acordo com DUROY et al. (2016), UMBER et al. (2016), CHABANNES et al. (2013), situações de estresses abióticos, tais como seca ou extremos de temperatura, podem eventualmente ativar sequências alélicas infecciosas, acarretando em uma infecção episomal por sequências de BSV integradas no genoma da planta. Sendo assim, a infecção de plantas por vírus torna-se um problema, tanto para programas de melhoramento genético, quanto para a certificação de mudas, principalmente em se tratando de culturas propagadas vegetativamente, como a bananeira, além de causar prejuízos às culturas em nível de campo, em virtude da infecção viral (CORDEIRO et al., 2014).

Nas nossas análises foi observado que dentre os 138 genótipos avaliados para a presença do BSV episomal, todos os vinte contêm apenas uma cópia do genoma B na sua constituição. Estudos mostram que o eBSV infeccioso pode vir a se manifestar ou não, a depender também do número de cópias do genoma na planta (HARPER et al., 1999; GAYRAL et al., 2008, 2010), principalmente nos genomas de *M. balbisiana* (GAYRAL e ISKRA-CARUANA, 2009). Os híbridos que abrigam genomas B haploides (genomas AB, AAB, AAAB) e contendo eBSV infeccioso, correm o risco de se tornar infectados; ao contrário dos híbridos com duas cópias do genoma B (Genomas ABB, AABB), nos quais a infecção não tem sido observada, mesmo sob condições de estresses (DUROY et al., 2016). Da mesma forma, CHABANNES et al. (2013) e ISKRA-CARUANA et al. (2010), citam que os diploides (BB) de *M. balbisiana*, são mais resistentes ao BSV episomal tanto de origem endógena quanto exógena. Nossos resultados corroboram com a literatura, considerando que os oito acessos BB analisados nenhum apresentou o BSV episomal para as três espécies indexadas.

O genoma de *M. balbisiana*, contém comumente as três espécies de eBSV (BSOLV, BSIMV e BSGFV) inseridas no seu genoma (GAYRAL et al., 2008; GEERING et al., 2005; HARPER et al., 1999; NDOWORA et al., 1999). Entretanto, não há relatos de epidemias das três espécies de BSV com a

presença destas integrações virais ativas no genoma da planta. Acredita-se que mecanismos de regulação de plantas impedem a liberação de genomas virais ativos por meio do silenciamento gênico (DUROY et al., 2016). De fato, parece que outros níveis de regulação, provavelmente genético, são necessários para induzir a liberação de uma partícula de vírus.

De acordo com DUROY et al. (2016) existe uma conservação sistemática do *locus* de integração em *M. balbisiana*. Também, o processo de evolução do eBSV parece estar relacionado ao rearranjo, ao invés da divergência das sequências nucleotídicas (GAYRAL et al., 2010; CHABANNES et al., 2013). A explicação para estas situações nos diploides BB permanece incerta (DUROY et al., 2016), desta forma, o mesmo autor sugere que os diploides de *M. balbisiana* com integrações iniciais de BSV podem ser os mais bem adaptados para resistir à alta pressão viral. Supõe-se que a seleção dentro de populações dos diploides BB poderia resultar na diminuição e extinção do contexto da epidemia viral. Como a eliminação do eBSV provavelmente envolve grande custo evolutivo, os diploides de *M. balbisiana* mantiveram o eBSV para controlar a infecção endógena por meio de silenciamento e duplicação do genoma. No entanto, os híbridos interespecíficos com um genoma B não possuem um sistema regulatório tão expressivo, podendo resultar em infecções espontâneas (DUROY et al., 2016).

Como exemplo deste evento, o diploide BB *Pisang Klutuk Wulung*, considerado principal controle positivo para eBSV e negativo para o BSV episomal, é portador das espécies BSGFV, BSOLV e BSIMV e ao mesmo tempo não apresenta sintomas da doença (CHABANNES et al., 2013).

As implicações teóricas deste estudo para maior elucidação do processo histórico e geográfico da domesticação de *Musa* spp., bem como implicações práticas para programas de melhoramento genético, são numerosas.

### **3.3. Análise comparativa entre plátanos, cultivares comerciais e diploides BB provenientes do campo e *in vitro* por IC-PCR + DNase**

Visando analisar a possibilidade da expressão do BSV em genótipos submetidos ao estresse causado por mais de 10 subcultivos em cultura de tecidos, fez-se uma comparação entre acessos com genoma B mantidos no



campo e *in vitro*, em nível molecular. Foram analisadas um total de 39 amostras, incluindo apenas os plátanos, cultivares comerciais e diploides BB, todos mantidos na coleção de germoplasma *in vitro* da Embrapa. A taxa de infecção por BSV epissomal, quando comparada às mesmas amostras indexadas, tanto no campo quanto *in vitro*, permitiu observar que praticamente em ambos os cultivos a presença de BSV epissomal foi semelhante (Tabela 4).

Nenhuma amostra *in vitro* analisada apresentou o vírus epissomal das espécies BSGFV e BSIMV. Por outro lado, das 15 amostras de plátanos analisadas, quatro apresentaram indexação positiva para espécie BSOLV, sendo que Terra Maranhão e Samura B foram positivos nos dois tipos de cultivo. Em relação às cultivares comerciais, apenas BRS Preciosa apresentou BSV epissomal para a espécie BSOLV. Para os diploides com genoma BB, nenhum apresentou PCR positivo para presença de BSV epissomal para as três espécies indexadas (Tabela 4 e Figura 3).

Em diferentes condições de estresse biótico e ou abiótico, como por exemplo, o hídrico e o ocasionado pelos frequentes subcultivos da cultura de tecidos, eventos de recombinação nas sequências integradas podem ser desencadeadas, resultando em infecções epissomais (NDOWORA et al., 1999; CÔTE et al., 2010; JAMES et al., 2011b).

Segundo DALLOT et al. (2001), a amplitude de subdivisão aplicada no cultivo *in vitro* pode modular a frequência de expressão do BSV a partir das sequências integradas. O aumento no número de subcultivos ao longo do tempo e a alta diversidade da infecção entre as plântulas resultantes da mesma linha micropropagada, indica que a expressão epissomal do BSV ocorre de forma aleatória e não simultânea nas diferentes células, o que pode estimular a infecção do vírus. Desta forma, a infecção de plantas por vírus torna-se um problema, tanto nos programas de melhoramento genético, quanto na certificação de mudas por tornar-se um obstáculo ao intercâmbio de germoplasma de plantas micropropagadas, como a bananeira (AYOH-JOHN et al., 2008), além de causar prejuízos às culturas em nível de campo.

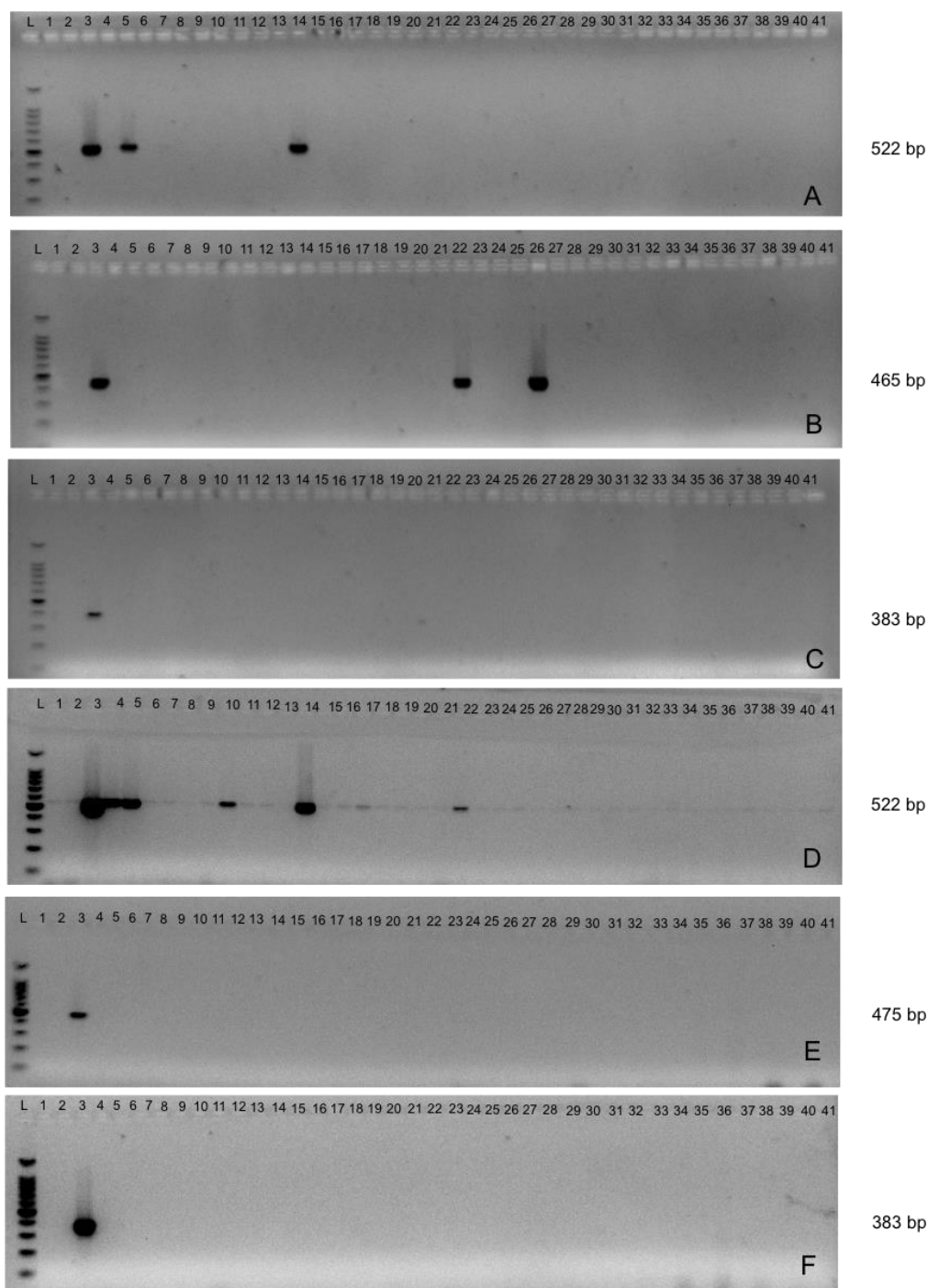
Apesar da baixa incidência de BSV epissomal demonstrada nos acessos provenientes do cultivo *in vitro*, provavelmente o fato da ocorrência de mais de 10 subcultivos nos genótipos avaliados desencadeou uma possível ativação

das EPRVs nas plantas indexadas. Desta forma, a redução do número de repicagens pode diminuir o estresse causado na planta, reduzindo assim o risco da ativação do BSV episomal.

**Tabela 4.** Indexação dos acessos da coleção de germoplasma de bananeira da Embrapa com a presença do genoma B mantidos em condições de campo e *in vitro* por meio da técnica de IC-PCR + DNase. Embrapa 2019.

Genótipos	Ploidia	Campo			<i>In vitro</i>		
		OL	GF	IM	OL	GF	IM
<b>Plátanos</b>							
Red Yad	AAB	-	-	-	+	-	-
Terra Maranhão	AAB	+	-	-	+	-	-
Tipo Velhaca	AAB	-	-	-	-	-	-
Terrinha	AAB	-	-	-	-	-	-
Terra Ponta Aparada	AAB	-	-	-	-	-	-
Pinha	AAB	-	-	-	-	-	-
Curare Enano	AAB	-	-	-	+	-	-
Comprida	AAB	-	-	-	-	-	-
D' Angola	AAB	-	-	-	-	-	-
Chifre de Vaca	AAB	-	-	-	-	-	-
Samurá B	AAB	+	-	-	+	-	-
Mongolo	AAB	-	-	-	-	-	-
Trois Vert	AAB	-	-	-	-	-	-
Terra Sem Nome	AAB	-	-	-	-	-	-
Terra Anã Branca	AAB	NT	NT	NT	-	-	-
<b>Cultivares</b>							
BRS Princesa	AAAB	-	-	-	-	-	-
BRS Pioneira	AAAB	-	-	-	-	-	-
BRS Garantida	AAAB	-	-	-	-	-	-
BRS Preciosa	AAAB	-	-	-	+	-	-
BRS Pacovan Ken	AAAB	-	+	-	-	-	-
BRS Maravilha	AAAB	-	-	-	NT	NT	NT
BRS Vitória	AAAB	-	-	-	-	-	-
BRS Caprichosa	AAAB	-	-	-	-	-	-
BRS Platina	AAAB	-	+	-	-	-	-
BRS Tropical	AAAB	-	-	-	-	-	-
BRS Pacoua	AAAB	-	-	-	-	-	-
BRS Japira	AAAB	-	-	-	-	-	-
BRS Thap Maeo	AAB	-	-	-	-	-	-
BRS SCS Belluna	AAB	-	-	-	-	-	-
BRS Caipira	AAA	-	-	-	-	-	-
BRS Pacovan	AAB	-	-	-	-	-	-
<b>Diploides BB</b>							
<i>Musa balbisiana</i>	BB	-	-	-	-	-	-
Diploide da Bélgica	BB	-	-	-	-	-	-
Butuhan	BB	-	-	-	-	-	-
Monthan	BB	-	-	-	-	-	-
BB IAC	BB	-	-	-	-	-	-
BB França	BB	-	-	-	-	-	-
BB Panamá	BB	-	-	-	-	-	-
Balbisiana Franca	BB	-	-	-	-	-	-

NT= Não testada, OL= *Banana Streak Obinol'Ewai Vírus* (primer BSOLV), GF= *Banana Streak Goldfinger Vírus* (primer BSGFV), e IM=*Banana Streak Imovè Vírus* (primer BSIMV).



**Figura 3.** Indexação dos plátanos, cultivares comerciais e diploides BB por IC-PCR + DNase para as espécies BSOLV, BSGFV e BSIMV. (A, B e C): Acessos mantidos em campo, (L) = marcador 100pb, (1) = controle da reação (água), (2) = controle negativo, (3) = controle positivo para as espécies virais (A) BSOLV (522pb), (B) BSGFV (475pb) e (C) BSIMV (383pb), respectivamente. De 4 – 41: Plátanos, Cultivares e Diploides BB. (D, E e F): Acessos mantidos *in vitro*. (L) = marcador 100pb, (1) = controle da reação (água), (2) = controle negativo, (3) = controle positivo para as espécies virais (E) BSOLV (522pb), (F) BSGFV (475pb) e (G) BSIMV (383pb), respectivamente. De 4 – 41: Plátanos, Cultivares e Diploides BB. Embrapa 2019.

LOCKHART e JONES (2000) e SELVARAJAN e BALASUBRAMANAIN (2008), citam que a manifestação da doença causada pelo vírus BSV epissomal em bananeiras é mais expressiva no cultivo em campo, devido a utilização de materiais de plantio infectados e em menor escala devido a propagação por mudas infectadas.

As espécies virais de BSV estudadas (BSOLV, BSGFV e BSIMV), possuem a capacidade de liberar sequências do vírus completas no genoma da bananeira, contribuindo, desta forma, para manifestação da doença causada por BSV epissomal na planta de forma isolada ou mista. No entanto, tanto as amostras do campo quanto *in vitro* analisadas no presente estudo, apresentaram apenas uma espécie de vírus epissomal por acesso, sendo a espécie BSOLV prevalecente em ambos os cultivos.

As cultivares e acessos de bananeiras analisados neste estudo são utilizados para a produção de frutos e também como fontes de resistência a doenças e características agrônômicas de interesse para o uso no programa de melhoramento de banana da Embrapa. Desta forma, a detecção do vírus BSV epissomal por meio da indexação por IC-PCR + DNase é fundamental para identificar acessos livres do vírus ativado.

O presente trabalho mostrou os métodos e ferramentas necessárias para detecção de espécies de BSV epissomais em bananeira. No entanto, é necessário realizar trabalhos adicionais sobre caracterização dos fragmentos infecciosos de BSV e identificar para quais acessos os fragmentos infecciosos são ativados em nível de campo e *in vitro*.

Portanto, os métodos utilizados no presente estudo permitem uma maior confiabilidade aos resultados por identificar apenas a presença do DNA do vírus BSV presente na planta, evitando diagnóstico falsos-positivos ou negativos.

#### **4. CONCLUSÕES**

- Os acessos com o genoma B da coleção de germoplasma da Embrapa possuem a presença de ao menos uma das três espécies virais BSOLV,

BSGFV ou BSIMV inseridos no genoma da bananeira na forma endógena.

- Os acessos de bananeira com genoma B da coleção de germoplasma da Embrapa possuem baixa incidência de BSV epissomal, sendo a espécie prevalecente o BSOLV.
- Os plátanos, cultivares comerciais e diploides BBs do cultivos *in vitro* apresentaram baixa frequência de BSV epissomal, apesar de já terem passados por mais de 10 subcultivos.
- A espécie BSIMV endógena foi encontrada em poucos acessos, não sendo identificada em nenhum genótipo de forma isolada.

## REFERÊNCIAS

ALVES, P. C. M. S. **Detecção e caracterização molecular de isolados de Banana Streak Vírus (BSV) no Brasil.** Dissertação (Biotecnologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras. Lavras – Minas Gerais, p. 74, 2013.

AMARO, A. A.; FAGUNDES, P. R.S. Aspectos econômicos e comercialização. In Ferreira, C. F... et al. (org). **O agronegócio da banana.** Brasília, DF: Embrapa, p. 729-752, 2016.

AYO-JOHN, E. I.; HUGHES, A. J.; EKPO, E. J. A. Survey for CMV in field samples of *Musa spp.* in southern Nigeria. **International Journal of Pest Management.** v. 54, n. 2, p.167-172, 2008.

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

BRIOSO, P.S.T.; CORDEIRO, Z.J.M.; REZENDE, J.A.M.; KITAJIMA, E.W.; PIMENTEL, J.P.; FIGUEIREDO, A.R. Infecção mista em bananeiras pelos vírus do mosaico do pepino ("*Cucumber mosaic vírus*", CMV) e da risca da bananeira ("*Banana streak vírus*", BSV) no Brasil. **Summa Phytopathologica,** v.26, n.2, p. 254-257, 2000.

CHABANNES, M.; BAURENS, F. C.; DUROY, P. O; BOCS, S.; VERNEREY, M. S.; GOUD, M. R.; BARBE, V.; GAYRAL, P.; ISKRA-CARUANA, M. L. Three infectious viral species lying in wait in the Banana Genome. **Journal of Virology,** v.87,p.862-863, 2013.

CORDEIRO, Z.J.M.; MEISSNER FILHO, P.E.; RITZINGER, C.H.S.P.; MATOS, A.P. **Sistema de produção de banana para o estado do Pará.** Sistema de Produção Embrapa, 2ª edição, 2014. Disponível em: <https://www.spo.cnptia.embrapa.br/conteudo>. Acesso em abril de 2018.

CÔTE, F. X.; GALZI, S.; FOLLIOT, M; LAMAGNÈRE, Y.; TEYCHENEY, P.Y.; ISKRA-CARUANA, M.L. Micro propagation by tissue culture triggers differential expression of infectious endogenous *Banana streak vírus* sequences (eBSV) present in the B genome of natural and synthetic interspecific banana plantains. **Molecular Plant Pathology**, v.1, p. 137-144, 2010.

DALLOT, S.; ACUNA, P.; RIVERA, C.; RAMIREZ, P.; COTE, F.; LOCKHART, B. E. L.; CARUANA, M. L. Evidence that the proliferation stage of micro propagation procedure is determinant in the expression of Banana streak vírus integrated into the genome of the FHIA 21 hybrid (*Musa AAAB*). **Archives of Virology** v.146, p. 2179-2190, 2001.

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

DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, v.12, p.13-15, 1990.

DUROY, P. O; PERRIER, X.; LABOUREAU, N.; JACQUEMOUD-COLLET, J. P.; ISKRA-CARUANA, M. L. How endogenous plant Para retroviruses shed light on *Musa* evolution. **Annals of Botanic**. v. 117, n. 4, p. 625-641, 2016.

**FAOSTAT** – Food and Agriculture Organization of the United Nations Statistics. Disponível em <<http://www.fao.org/faostat/en/#home>> Acesso: 18 dezembro de 2018.

FIGUEIREDO, D.V.; MEISSNER FILHO, P. E.; SILVA NETO, S. P.; BRIOSO, P. S. T. Detection and analysis of Banana streak vírus (BSV) sequences variability of banana from Brazil. **Summa Phytopathologica** v.32, p. 118-123, 2006.

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

GAYRAL, P.; BLONDIN, L.; GUIDOLIN, O. Evolution of endogenous sequences of banana streak virus: what can we learn from banana (*Musa* sp.) evolution? **Journal of Virology**, v.84, n.14, p.7346-7359, 2010.

GAYRAL, P.; NOA-CARRAZANA J.C.; LESCOT, M.; LHEUREUX, F.; LOCKHART, B.E.; 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; 2008.

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

GEERING, A. D. W.; POOGGIN, M. M.; OLSZEWSKI, N. E.; LOCKHART, B. E. L.; THOMAS, J. E. Characterization of Banana streak Mysore virus and evidence that its DNA is integrated in the B genome of cultivated *Musa*. **Archives of Virology**, v. 155, n. 4, p. 787-96, 2005a.

GEERING, A. D.; OLSZEWSKI, N. E.; DAHAL, G.; THOMAS, J. E.; LOCKHART, B. E. L. Analysis of the distribution and structure of integrated Banana streak virus DNA in a range of *Musa* cultivars. **Molecular Plant Pathology**, v. 2, n. 4, p. 207-213, 2001.

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, 1999.



ISKRA-CARUANA, M.L.; CHABANNES, M.; DUROY, P.O.; MULLER, E. A possible scenario for the evolution of Banana Streak virus in banana. **Virus Research**, v. 186, n. , p. 155-162, 2014.

ISKRA-CARUANA, M.L.; BAURENS, F.C.; GAYRAL, P.; CHABANNES, M. A four-partnerplant-virus interaction: enemies can also come from within. **Molecular Plant Microbe Interaction**, v.23, n.11, p.1394-1402, 2010.

JAKOWITSCH, J.; METTE, M. F.; VAN DER WINDEN, J.; MATZKE, M. M. A. Integrated pararetroviral sequences define a unique class of dispersed repetitive DNA in plants. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. v. 96, p.13241-13246, 1999.

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, n.1, p. 57-62, 2011.

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

JAVER-HIGGINSON, E.; ACINA-MAMBOLE, I.; GONZALEZ, J. E.; FONT, C.; GONZÁLEZ, G.; ECHEMENDIA, A. L.; MULLER, E.; TEYCHENEY, P. Y. Occurrence, prevalence and molecular diversity of banana streak viruses in Cuba. **European Journal Plant Pathology**, v. 138, p. 157-166. 2014. DOI 10.1007/s10658-013-0319-z.

Le PROVOST, G.; ISKRA-CARUANA, M. L.; ACINA-MAMBOLE, I.; TEYCHENEY, P. Y. Improved detection of episomal Banana streak viruses by multiplex immunocapture PCR. **Journal Virology Methods**, v. 137, p. 7-13, 2006.

LHEUREUX, F.; CARREEL, F.; JENNY, C.; LOCKHART, B.; ISKRA-CARUANA, M. L. Molecular characterization of *Banana streak acuminata* Vietnam virus isolated from *Musa acuminata* siamea (banana cultivar). **Archives of Virology**, v. 152, n. 7, p. 1409-1416, July 2007.

LOCKHART B.E. L.; JONES, D. R. Banana streak virus. In: Jones DR (ed) **Diseases of Banana**. Abaca and Enset, CABI Publishing, 2000.

MANZO-SANCHEZ, G.; BUENROSTRO-NAVA, M. T.; GUZMAN-GONZALEZ, S.; OROZCO-SANTOS, M.; YOUSSEF, M.; ESCOBEDO-GRACIA, M. R. M. Genetic diversity in bananas and plantains (*Musa* spp.). In: CALISKAN, M. **Molecular Approaches to Genetic Diversity**, 2015 <https://doi.org/10.5772/59421>.

METTE, M. F.; KANNO, T.; AUFSATZ, W.; JAKOWITSCH, J.; VAN DER WINDEN, J.; MATZKE, M. A.; MATZKE, A. J. M. Endogenous viral sequences and their potential contribution to heritable virus resistance in plants. **EMBO Journal**, v. 21, n. 3, p. 461-469, 2002.

NDOWORA, T.; LOCKHART, B.E.L. Development of a serological assay detecting serologically diverse Banana streak virus isolates. In: Craenen, K, Ortiz R, Karamura EB, Vuylsteke D (Eds.) Proceedings of the First International Conference on Banana and Plantain for Africa. **Acta Horticulture** v.540, p.377-388, 2000.

NDOWORA, T.; DAHAL, G.; LAFLEUR, D.; HARPER, G.; HULL, R.; OLSZEWSKI, N.; LOCKHART, B. Evidence that Badnavirus infection in *Musa* can originate from integrated sequences. **Virology**, v.255, p.214-220, 1999.

PLOETZ, R.C.; THOMAS, I. E.; SLAUBAUG, W. E. Diseases of banana and plantain. In: PLOETZ, R. C. (Ed.). **Diseases of tropical fruit crops**. Orlando: CABI Publishing, 2003.

REAGIN, M.J.; GIESLER, T.L.; MERLA, A.L.; RESETAR-GERKE, J.M.; KAPOLKA, K.M.; MAMONE, J.A. TempliPhi: a sequencing template preparation procedure that eliminates *overnight* cultures and DNA purification. **Journal of Biomolecular Techniques**, v.14, n.2, p.143-148, 2003.

REMANS, T.; GROF, C. P. L.; EBERT, P. R.; SCHENK, P. M. Identification of functional sequences in the pregenomic RNA promoter of the Banana Streak vírus Cavendish strain (BSV-Cav). **Vírus Research** v.108, p.177-186. 2005.

RIBEIRO, L. R.; OLIVEIRA, L. M.; SILVA, S.O. E.; BORGES, A. L. Avaliação de cultivares de bananeira em sistema de cultivo convencional e orgânico. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 35, n. 2, p. 508-517, 2013.

SELVARAJAN, R.; BALASUBRAMANAIN, V. Banana víruses. In: Rao GP, Myrta A, Ling K. (eds) Characterization, Diagnosis and Management of Plant Víruses, Texas, SA, **Studium Press**, LLC, v. 2, p. 109-124, 2008.

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

SILVEIRA, D. G. MEISSNER FILHO, P. E.; SOARES, T. M.; SANCHES, N. F.; FIGUEIREDO, D. V.; BRIOSO, P. S. T. Indexação biológica de genótipos de bananeira para o Banana Streak vírus. **Summa Phytopathologica**, v.34, p.172- 174, 2008.

STAGINNUS, C.; ISKRA-CARUANA, M. L.; LOCKHART, B. E. L.; HOHN, T.; RICHERT-POGGELER, K. R. Suggestions for a nomenclature of endogenous pararetroviral sequences in plants. **Archives of Virology**, New York, v. 154, n. 7, p. 1189-1193, 2009.

UMBER, M.; PICHAUT, J.P.; FARINAS, B.; LABOUREAU, N.; JANZAC, B.; PINEAU, K.P.; PRESSAT, G.; BAURENS, F.C.; CHABANNES, M.; DUROY, P.O.; DELOS, J.M.; JENNY, C.; ISKRA-CARUANA, M.L.; SALMON, F.; TEYCHENEY, P.Y. Marker-assisted breeding of *Musa balbisiana* genitors devoid of infectious endogenous Banana streak virus sequences. **Molecular Breeding**, v.3, p.74, 2016.

**Levantamento e indexação de espécies do Vírus das Estrias da Bananeira  
(BSV) em regiões produtoras de banana do Brasil**

## Levantamento e indexação de espécies do Vírus das Estrias da Bananeira (BSV) em regiões produtoras de banana do Brasil

**Resumo.** O vírus das estrias da bananeira pertence à família *Caulimoviridae*, gênero *Badnavirus* e pode ocorrer em duas formas, endógena (eBSV), integrada ao genoma do hospedeiro e epissomal. Existem duas formas de integração do BSV em *Musa* spp. A primeira, a sequência viral é incompleta e incapaz de causar a infecção. A segunda, o integrante viral é uma sequência viral completa e funcional, que em situação de estresse, pode desencadear a infecção na planta. Esse tipo de integrante é comum à espécie *M. balbisiana*, portadora do genoma B. Nesse sentido, o objetivo desse trabalho foi realizar um levantamento sobre a ocorrência de espécies de BSV nas principais áreas de produção de banana no Brasil por indexação a partir do uso da técnica IC-PCR + DNase. Para tanto, foram coletadas um total de 237 amostras em oito regiões produtoras de banana do Brasil, nos seguintes Estados: Pará, Bahia, Piauí, Pernambuco, Minas Gerais, São Paulo, Rio Grande do Sul e Santa Catarina. Para a análise de incidência e prevalência foi utilizado um total de 16 *primers* espécie-específicos. Das amostras analisadas, 175 foram positivas para ao menos uma espécie do eBSV. Um total de 126 amostras que apresentaram resultado positivo para presença do eBSV, conteve espécies virais BSOLV e BSGFV inseridas no genoma da planta. Das 62 amostras as quais não foram identificadas nenhuma das três espécies de BSV estudadas, 39 pertencem ao estado da Bahia. Integrações virais apenas para a espécie BSGFV foram detectadas em 13 amostras do Estado do Piauí e em uma amostra do Estado do Pará; a espécie BSOLV foi constatada de forma isolada em 14 amostras coletadas nos Estados de Minas Gerais, Piauí, Pará e Santa Catarina. Uma única amostra do Estado da Bahia apresentou a espécie BSIMV. Das amostras analisadas, apenas aquelas coletadas nos Estados de São Paulo e Santa Catarina apresentaram a presença do BSV epissomal. Estas regiões produtoras onde foram identificadas plantas com sintomas de BSV possuem invernos rigorosos com temperaturas baixas, sendo esse estresse abiótico um dos fatores prováveis da presença do vírus ativo nas plantas. Observou-se que a maioria das amostras analisadas possui a presença do BSV endógeno, muito provavelmente com sequências virais incompletas inserida no genoma nuclear da planta. Este fato pode ser confirmado devido à baixa presença do BSV epissomal observado nas amostras analisadas por IC-PCR + DNase.

**Palavras-Chave:** IC-PCR+ DNase, banana, eBSV, Fitopatologia.

## Survey of species of Banana Streak Vírus (BSV) by indexation in major banana producing regions in Brazil

**Abstract.** Banana streak vírus belongs to the *Caulimoviridae* family, genus *Badnavirus* and may occur in two forms, endogenous, integrated in the genome of the host and episomal. There are two forms of BSV integration in *Musa* spp. The first one consists of the incorporation of an incomplete sequence incapable of causing the disease and the second one, complete sequence whereas in the presence of stress may trigger the disease in the host plant. This type of integrant is common in the *M. balbisiana* species carrier of the B genome. Therefore, the objective of the present work was to survey the occurrence of BSV species in main banana producing areas in Brazil by indexation using IC-PCR + DNase. A total of 237 samples were collected in eight banana producing regions, in the following States: Pará, Bahia, Piauí, Pernambuco, Minas Gerais, São Paulo, Rio Grande do Sul and Santa Catarina. For the incidence and prevalence analysis, a total of 16 species-specific primers were used. Of the samples analyzed as to integration of BSV sequences, 174 were positive for at least presenting one of the species in its genome. The total of 126 samples which were positive for eBSV had BSOLV and BSGFV species inserted in the genome. Of the 63 samples free from the sequences of the three BSV species, 39 belonged to the State of Bahia. Isolated viral integrations were detected in 29 samples being from the State of Piauí and one from the State of Pará (BSGFV); 14 from the States of Minas Gerais, Piauí, Pará and Santa Catarina (BSOLV) and one sample with BSIMV from the State of Bahia. Of the sample analyzed, only one sample from the State of São Paulo and Santa Catarina presented episomal BSV. In these producing regions where plants presented BSV symptoms, the winter is harsh with low temperatures, whereas this abiotic stress could be a probable cause of the disease with the active vírus in the plants. Most samples analyzed had endogenous BSV. However, these samples probably have incomplete viral sequences in their genome. This can be confirmed by the low presence of episomal BSV in the samples analyzed.

**Key-words:** IC-PCR+ DNase, banana, eBSV, Phytopathology.

## 1. INTRODUÇÃO

O vírus das estrias da bananeira pertence à família *Caulimoviridae*, gênero *Badnavirus* e pode ocorrer em duas formas: endógena, integrada ao genoma do hospedeiro e epissomal. Essas formas podem ser transmitidas e infectivas a depender do hospedeiro e das condições de estresse (GAYRAL e ISKRA-CARUANA, 2009).

O vírus das estrias da bananeira possui sequências integradas no genoma da bananeira, sendo essas seqências denominadas de endógena (eBSV) ou *Endogenous Pararetrovirus* (EPRV) (NDOWORA et al., 1999; GREGOR et al., 2004).

Existem duas formas de integração do BSV em *Musa* spp.. Na primeira, a sequência viral é incompleta e incapaz de causar a infecção. Essa sequência viral é considerada disfuncional e geralmente é encontrada tanto em espécies de *Musa acuminata* Colla (genoma A), quanto em espécies de *Musa balbisiana* Colla (genoma B). A segunda integrante viral é uma sequência viral completa e funcional, que em situações de estresse, pode desencadear a infecção na planta; esse tipo de integrante é comum à espécie *M. balbisiana*, portadora do genoma B (GEERING et al., 2001). Embora sequencias incompleta tenham sido encontrados em ambos os genomas A e B, formas ativáveis endógenas de BSV só foram detectados no genoma B de vários acessos de bananeira, particularmente sujeitos a certas condições, tais como estresse por seca e pelo cultivo *in vitro* (GEERING et al., 2005).

O BSV é considerado um dos principais vírus que acometem a bananeira, especificamente por reduzir a produtividade e a qualidade final dos frutos; além de provocar a má formação dos mesmos, a redução do número de cachos e de frutos por cacho ou até mesmo o apodrecimento do pseudocaule, levando à morte da planta (FIGUEIREDO et al., 2006; JAMES et al., 2011a; SANT'ANA, 2013; NOUMBISSIE-TOUKO, 2014). Além disso, o BSV pode causar alterações no metabolismo dos hormônios de crescimento da planta, causando redução do tamanho de folhas, flores e raízes, e o encurtamento dos pecíolos e entrenós (SILVEIRA et al., 2007; 2008).



Existem algumas técnicas para a detecção do BSV, entre as quais: o teste sorológico DAS-ELISA, a técnica de PCR convencional, IC-PCR, e Amplificação por Círculo Rolante (RCA), as quais são incapazes de detectar com precisão as diferentes espécies de BSV, gerando resultados falso positivos. Além disso, as técnicas não possuem a capacidade de discriminar entre o BSV epissomal e o endógeno, podendo gerar resultados falso-negativos por erroneamente analisar o genoma da bananeira contendo a sequência do vírus inserida e não a presença do vírus *per se* (FIGUEIREDO et al., 2006; GEERING et al., 2000; JAMES et al., 2011a; JAMES et al., 2011b).

Dada essas inconsistências nas análises do BSV, o Centro de Cooperação Internacional em Pesquisa Agronômica para o Desenvolvimento (CIRAD, França), aprimorou a metodologia IC-PCR (Immunocapture - PCR), por meio do uso da DNase(IC-PCR + DNase), que tem como principal vantagem digerir o DNA da bananeira aderido às paredes do tubo de PCR evitando resultados falso-positivos(HARPER et al., 1999). Essa técnica é de implementação simples e bem mais robusta que qualquer outra aplicada até o momento (ISKRA-CARUANA,comunicação pessoal).

No Brasil são poucos os trabalhos que visam analisar a presença do BSV em áreas de produção de banana (MADHULATA et al., 2004; BRIOSO et al., 2011;SILVA et al., 2003; SILVA et al., 1999; SILVA et al., 1998). Esses trabalhos utilizaram em sua maioria, apresentam limitações já apresentadas, sendo a ausência de diagnose precisa do BSV epissomal um sério problema.

Nesse sentido o objetivo desse trabalho é realizar um levantamento sobre a ocorrência e prevalencia de espécies de BSV em áreas de produção de banana no Brasil por indexação, a partir do uso da técnica IC-PCR + DNase. Esse é o primeiro trabalho utilizando essa ferramenta de diagnose no Brasil.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1. Material Vegetal**

Foram coletadas um total de 237 amostras de folhas de plantas de bananeiras sintomáticas ou não para a presença de BSV em oito regiões produtoras de banana brasileiras, nos seguintes Estados: Pará, Bahia, Piauí, Pernambuco, Minas Gerais, São Paulo, Rio Grande do Sul e Santa Catarina. A maioria das amostras coletadas foi proveniente do Estado da Bahia, especificamente de três municípios, Bom Jesus da Lapa, com 61 amostras, Ponto Novo, com 24 amostras e Tancredo Neves, com nove amostras. As amostragens foram realizadas considerando as cultivares mais utilizadas pelos agricultores brasileiros em amostragens aleatórias em áreas de produção.

O DNA das amostras foi extraído segundo protocolo CTAB (brometo de cetiltrimetilamônio) descrito por Doyle e Doyle (1990), sendo a qualidade e quantidade avaliada em gel de agarose 1% (p/v) corado com brometo de etídio ( $1,0 \text{ mgL}^{-1}$ ) por comparação visual de diversas concentrações de DNA do fago Lambda (Invitrogen). Para a análise de incidência e prevalência das espécies virais, foi utilizado um total de 16 iniciadores espécie-específicos (Tabela suplementar 2) em reações de amplificação com volume final de  $15 \mu\text{L}$ . A indexação das amostras por IC-PCR + DNase foi realizada utilizando anticorpos policlonais (NDOWORA e LOCKHART, 2000), cedido pelo grupo de pesquisa do CIRAD.

## **2.2. Descrição dos primers espécie-específicos**

Para a análise de incidência e prevalência de espécies de BSV, 16 *primers* espécie-específicos divididos em duas categorias referentes à região de acesso no genoma viral e ou vegetal, foram utilizados: (1) iniciadores de junção (que acessam a região de junção entre o genoma viral e o de *Musa* spp.); (2) iniciadores internos ou estruturais, que acessam apenas o genoma viral integrado na planta (Tabela suplementar 2).

## **2.3. PCR multiplex**

Como sequências endógenas do BSV (eBSVs) são frequentemente encontradas no genoma de *Musa* spp., foi realizado, inicialmente, um PCR

multiplex com as 300 amostras foliares para identificar apenas as sequências genômicas das espécies virais do BSV endógeno nas amostras coletadas. Neste caso, foi utilizando o *primer* 25S como controle da região conservada do DNA de bananeira.

As reações de amplificação foram completadas para volume final de 15µL, contendo: Tampão 5X (Promega), dNTPs 0,2 mM, 0,2 µM de cada iniciador espécie-específico (IDT), e 0,2 µM do iniciador 25S, 30 ng de DNA genômico e uma 1U/µl de Taq DNA polimerase GoTaq (Promega). As amplificações foram conduzidas em termociclador Applied Biosystems (ABI), Veriti 96-well Thermal Cycler, utilizando temperatura de anelamento determinada para cada *primer* específico (Tabela Suplementar 2) (CHABANNES et al., 2013; GAYRAL e ISKRA-CARUANA, 2009; GEERING et al., 2005).

A condição de amplificação incluiu um ciclo de desnaturação de 5 min. a 94 °C, seguido de 30 ciclos de desnaturação de 30 segundos a 94 °C, 30 segundos, com temperatura de anelamento (Ta) específica de cada *primer*, 45 segundos de extensão a 72 °C, com uma extensão final de 10 min. a 72 °C e 14 °C ∞.

Os produtos da amplificação foram separados em gel de agarose 2% a 100 V, em tampão TBE 0,5X e corados em brometo de etídio (0,5 µl mL<sup>-1</sup>). Os fragmentos amplificados foram fotografadas utilizando fotodocumentador Gel Logic 2200 Pro. Os tamanhos dos fragmentos foram determinados baseados em padrão molecular de 100 pb (DNA Ladder Biolabs).

#### **2.4. Indexação por IC-PCR + DNase**

A imunocaptura foi realizada utilizando anticorpo policlonais (NDOWORA e LOCKHART, 2000), cedido pelo CIRAD. Para tanto, 25µL do anticorpo policlonal do BSV na diluição 1:6000 em tampão carbonato (15mM de carbonato de sódio, 34mM de bicarbonato de sódio, pH 9,6) foi depositado em microtubos de 2mL e deixados overnight a 4°C. As lavagens dos microtubos foram efetuadas duas vezes com 100µL de tampão PBS-Tween (135mM NaCl,

1,4mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2,6mM KCl, 8mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,05% Tween20, pH 7,4) e uma vez com 100uL de água ultra pura.

Os extratos foliares foram pesados (0,5g) e colocados em sacos plásticos sendo processados em equipamento acoplado em furadeira na presença de 5mL do tampão de maceração (2% PVP40, 0,2% de sulfito de sodio e 0,2% de BSA, preparado em PBS-T). 1mL deste extrato foi transferido para microtubos e centrifugados a 3000g/3minutos, em temperatura ambiente. Aliquotas de 25uL do sobrenadante foram adicionadas aos microtubos cobertos com o anticorpo e incubados na temperatura ambiente por 3 horas. Novamente os microtubos foram lavados duas vezes com PBS-T e uma vez com água ultra pura e então levemente secos. Em seguida foi adicionado o mix da DNase (3uL do tampão da enzima, 3uL da DNase, 24uL água ultra pura) e incubados a 37°C por 45 minutos. Após incubação foi feita a PCR diretamente nos microtubos, como descrito no item 3. Foram utilizados os *primers* espécie-específicos para BSOLV, BSGFV e BSIMV, descritos anteriormente.

Os produtos da amplificação foram separados em gel de agarose 2% a 100 V, em tampão TBE 0,5X e corados em brometo de etídio (0,5 µl mL<sup>-1</sup>). Os fragmentos amplificados foram fotografados utilizando fotodocumentador Gel Logic 2200 Pro. Os tamanhos dos fragmentos foram determinados baseados em padrão molecular de 100pb (DNA Ladder Biolabs).

### **3. RESULTADOS**

#### **3.1. Detecção de espécies de BSV das diferentes regiões produtoras de banana do Brasil**

A análise de PCR multiplex com *primers* espécie-específicos para BSOLV, BSGFV e BSIMV; e *primer* 25S (região conservada do DNA de bananeira) permitiu observar que, das 237 amostras analisadas, 175 foram positivas para a presença de ao menos uma espécie de BSV endógeno, correspondendo a 74% da amostragem realizada. Todas estas amostras possuem o genoma B na sua constituição. Das 62 amostras onde não foram

identificadas as três espécies de eBSV, 39 foram coletadas no estado da Bahia (Tabela 1).

Integrações virais mistas pela presença das espécies BSOLV + BSGFV foram identificadas em 126 amostras. Apenas três das amostras analisadas apresentaram as três espécies de BSV integradas no genoma da planta simultaneamente, sendo estas coletadas no Estado da Bahia. Não houve detecção de integrações mistas do tipo BSGFV + BSIMV (Tabela 1).

Foram confirmadas integrações virais isoladas em 29 amostras, sendo 13 provenientes do Estado do Piauí, e uma no Estado do Pará, no que se refere a espécie BSGFV; cinco nos Estados de Minas Gerais, duas no Pará, três no Piauí, e quatro em Santa Catarina no que se refere a espécie BSOLV e uma amostra com BSIMV proveniente do Estado da Bahia (Tabela 1).

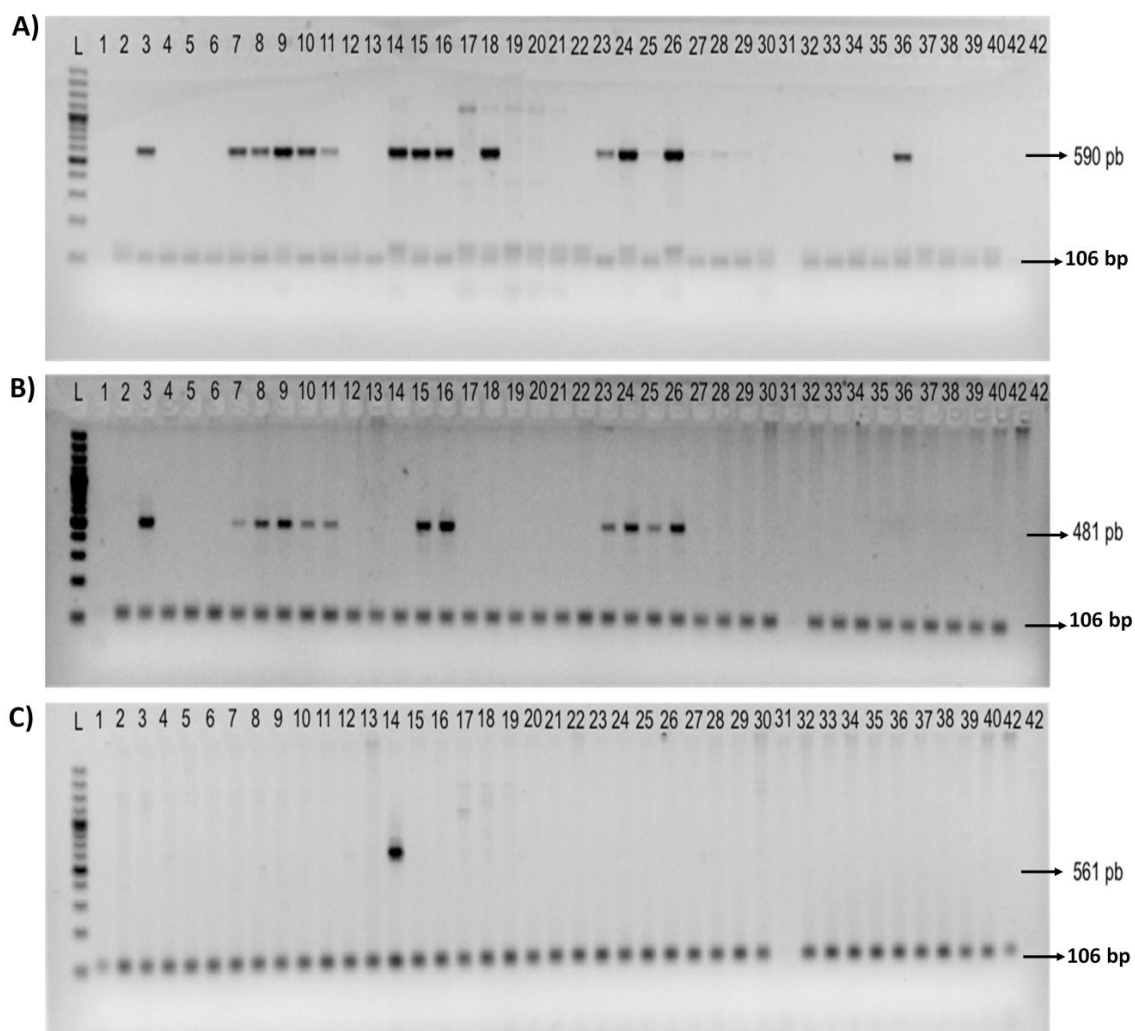
**Tabela 1.** Integrações virais de espécies do vírus das estrias da bananeira (BSV) em amostras coletadas em áreas de produção de banana no Brasil. Embrapa 2019.

Estados	Nº de amostras	Amostras								Total
		sem espécies BSV	BSGFV (1)	BSOLV (2)	BSIMV (3)	1+2	1+3	2+3	1+2+3	
Bahia	94	39	0	0	1	45	0	6	3	55
Minas Gerais	24	0	0	5	0	11	0	8	0	24
Pará	20	4	1	2	0	13	0	0	0	16
Pernambuco	5	0	0	0	0	5	0	0	0	5
Piauí	40	2	13	3	0	20	0	2	0	38
Rio G. do Sul	16	0	0	0	0	16	0	0	0	16
Santa Catarina	38	17	0	4	0	16	0	1	0	21
<b>Total</b>	<b>237</b>	<b>62</b>	<b>14</b>	<b>14</b>	<b>1</b>	<b>126</b>	<b>0</b>	<b>17</b>	<b>3</b>	<b>175</b>

\*Primers: BSOLV= *Banana Streak Obinol'Ewai Vírus*, BSGFV= *Banana Streak Goldfinger Vírus* e BSIMV= *Banana Streak Imovè Vírus*

A maior incidência de eBSV foi encontrada nos estados de Minas Gerais, Pernambuco e Rio Grande do Sul, onde foi detectada a presença de integrações virais em todas as amostras analisadas, com predominância do BSOLV + BSGFV. No estado de Minas Gerais são plantadas principalmente as cultivares BRS Princesa, Prata-Anã e Maçã; enquanto no Rio Grande do Sul são BRS Platina e Prata-Anã.

A análise das amostras coletadas nos municípios do Estado de Santa Catarina (Schoreader, Guaramirim, Siderópolis, Pedras Grandes, Santa Rosa do Sul e Corupá) está apresentada na Figura 2.



**Figura 2.** PCR multiplex de amostras de bananeira coletadas em municípios no Estado de Santa Catarina para presença de espécies do vírus das estrias da bananeira (BSV). (A) *primer* BSOLV= 590pb, (B) *primer* BSGFV = 481pb, *primer* BSIMV = 561pb. (L) marcador 100pb; (1) = controle da reação (água), (2) = C- e (3) = C+; 106 pb = 25S (rDNA), controle interno para DNA de bananeira. Embrapa 2019.

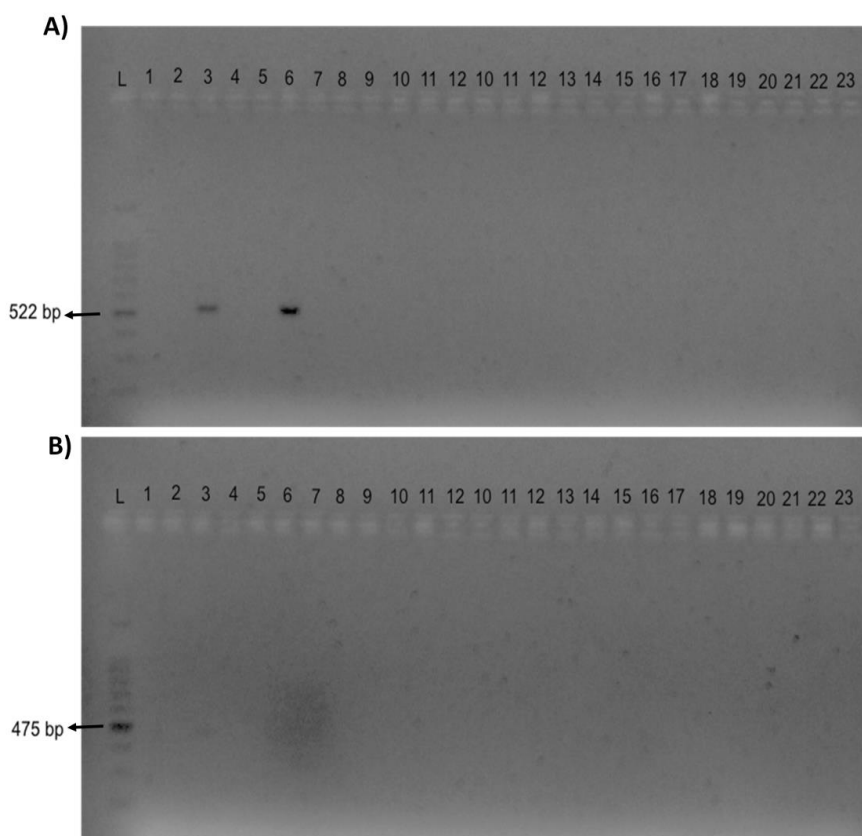
### 3.2. Indexação por meio de IC-PCR das amostras de diferentes regiões produtoras do Brasil

Considerando que, das 237 amostras analisadas nos oito estados do Brasil quanto a presença do complexo BSV, 175 apresentaram resultado

positivo para alguma espécie do vírus de forma isolada e ou mista foi feita a indexação por IC-PCR + DNase das amostras provenientes dos Estados de São Paulo, Rio Grande do Sul e Santa Catarina de forma a detectar a presença do complexo BSV epissomal (Figura 3).

Das oito amostras provenientes do Estado de São Paulo apenas uma amostra (Prata-Anã), da região produtora de Aguai-SP, apresentou resultado positivo para o complexo BSV epissomal da espécie BSOLV. Inclusive foi observado sintomas aparentes da doença por toda a área de cultivo. Não foi detectado BSV epissomal nas amostras coletadas nos municípios do Rio Grande do Sul.

Das trinta e oito amostras coletadas no Estado de Santa Catarina, nove amostras foram submetidas à indexação por IC-PCR+DNase. Destas, cinco apresentaram BSV epissomal da espécie viral BSOLV (dados não mostrados).



**Figura 3.** Indexação por IC-PCR + DNase de amostras de bananeira coletadas em diferentes regiões produtoras de banana no Brasil quanto a presença de espécies do vírus das estrias da bananeira (BSV). (L) Marcador de 100pb, (1) = controle da reação (água), (2) = C-, (3) = C+ para as espécies BSOLV (A) e BSGFV (B), respectivamente. Amostras 4 - 12: Estado São Paulo; Amostras 13 - 23: Rio Grande do Sul. Embrapa, 2019.

Indexação por IC-PCR + DNase também foram realizadas com as demais amostras dos Estados da Bahia, Minas Gerais, Pará, Pernambuco e Piauí que apresentaram PCR positivo para o BSV endógeno, as quais confirmaram a ausência do BSV episomal em todas as amostras indexadas. No entanto, considerando o longo tempo em que tais amostras foliares ficaram acondicionadas no -80 antes de proceder a indexação, seria interessante fazer novas coletas para confirmar os resultados obtidos.

#### 4. DISCUSSÃO

Das 237 amostras analisadas, 175 contém o genoma B e 62 amostras apenas o genoma A. As amostras que apresentaram resultado positivo para presença do BSV endógeno possuem menos uma cópia do genoma B.

Os primeiros eventos de integrações virais aconteceram entre espécies de *M. balbisiana* (genoma B), por meio do processo de co-evolução entre o vírus e a bananeira. Em seguida, as infecções virais ocorreram por meio de eventos maciços de integrações virais no genoma de bananeiras selvagens, conferindo resistência/tolerância ao vírus para a espécie *M. balbisiana* (ISKRA-CARUANA et al., 2014). No decorrer do processo evolutivo, essas sequências virais tornaram-se parte do genoma B das plantas via integração na linhagem germinativa, fixando-se na população pela ação das forças evolutivas de seleção natural e/ou deriva genética (GAYRAL et al., 2008). Como exemplo deste evento, o genótipo diploide (BB) PKW (*Pisang klutuk wulung*) é portador de sequências virais de três espécies de BSV, BSGFV, BSOLV e BSIMV e no entanto, não apresenta sintomas da doença (CHABANNES et al., 2013).

O vírus das estrias da bananeira (BSV) foi relatado pela primeira vez no Brasil por Brioso et al. (2000) e depois foi diagnosticado infectando amostras coletadas em diferentes regiões do país, especificamente nos estados do Acre, Amazonas, Bahia, Ceará, Goiás, Minas Gerais, Piauí, Rio de Janeiro, Rondônia, Santa Catarina e São Paulo (FIGUEIREDO e BRIOSO, 2007; FIGUEIREDO et al., 2006). Estudo realizado por meio da técnica *Triple Anti body Sandwich-ELISA* (TAS-ELISA) e *Plate Trapped Antigen-ELISA* (PTA-ELISA), com amostras de bananeiras provenientes de diferentes regiões



produtoras de São Paulo (Atibaia e Jacupiranga) e Santa Catarina (Corupá), mostrou que as amostras de bananeiras analisadas apresentaram o vírus BSV associado com o vírus CMV. No entanto, nas amostras provenientes dos municípios de São Lourenço da Serra e Votuporanga no Estado de São Paulo e Jataí em Goiás foram identificadas apenas a presença do vírus BSV nas amostras analisadas (COLARICCIO et al., 2006).

Os problemas fitossanitários na bananicultura têm causado prejuízos na produção e economia dos produtores de banana das diferentes regiões produtoras do Brasil, como no Vale do Ribeira (23 municípios), Norte de Minas Gerais (Janaúba, Jaíba, Pirapora, Montes Claros e Itacarambi), Norte de Santa Catarina (Corupá, Massaranduba, Jaraguá do Sul, Guaramirim, Praia Grande, Luís Alves e Schroeder), Nordeste (Petrolina, Juazeiro, Bom Jesus da Lapa e Formoso) e Espírito Santo (MATTHIESEN e BOTEON, 2002). Estudo realizado com 95 amostras de bananeiras coletadas em diferentes regiões produtoras do país mostrou que 59 amostras foram PCR positivo para o vírus BSV (FIGUEIREDO et al., 2006).

Alguns estudos sobre diversidade e levantamento do BSV têm sido realizados em países do mundo. Estudos realizados em Cuba identificaram espécies virais de BSV: BSMYV, BSIMV e BSGFV com identidade superior a 96% com isolados do GenBank (JAVER et al., 2009). Ainda em regiões cubanas, anos mais tarde, Javer-Higginson et al. (2014) ao analisarem 512 amostras de folhas de sete cultivares de *M. acuminata* coletadas de onze fazendas espalhadas em oito províncias, observaram que a prevalência global das espécies BSOLV, BSGFV e BSIMV foi baixa, com maior incidência de BSMYV, embora todas as amostras tivessem sido coletadas de terrenos infestados por cochonilha (JAVER-HIGGINSON et al., 2014). Híbridos de bananeiras podem ser uma fonte de partículas virais para transmissão de BSV por cochonilhas, seguido da ativação do BSV episomal sob condições de cultivo em campo (MEYER et al., 2008).

Estudos realizados com plátanos na Costa do Marfim, mostraram uma predominância de BSOLV nas diferentes regiões visitadas no Sul, Sudeste, Leste, Centro e Centro-Oeste do país (KOAUDIO et al., 2016;2013), com altas incidências nas localidades de Zuénoula, Bongouanou, Abengourou, Issia e

Bouaflé (KOAUDIO et al., 2016). De acordo, com os autores, a prevalência de BSOLV nas principais áreas de produção de banana na Costa do Marfim pode ser devido uma transmissão viral por meio da troca de material de plantio contaminado entre produtores. Ainda na África, a espécie viral BSOLV foi relatada em bananeira em diversos países, como Benin, Nigéria, Gana (KUMAR et al., 2014). Da mesma forma, James et al. (2011b) identificaram seis novas espécies de BSV (BSUAV, BSUIV, BSULV, BSUMV, BSUIV, BSIMV e BSCAV) no leste da África.

O conhecimento sobre a presença do vírus das estrias da bananeira em diferentes regiões produtoras do Brasil auxilia na estimativa do quão disseminada está a doença no país, além de permitir que se atribua o aparecimento da doença devido algum estresse ambiental caso se verifique a presença de sequencia eBSVs ativas nas plantas e dessa forma contribui para o desenvolvimento/refinamento de ações para o controle da propagação do vírus, evitando surtos epidêmicos como observado desde 1990 em países do continente africano (ISKRA-CARUANA et al., 2014).

Neste estudo, todas amostras com o genoma B apresentaram integrações virais de BSV inseridas no genoma da planta. No entanto, apenas seis amostras apresentaram a doença causada pelo BSV epissomal. No estado de São Paulo foi identificado apenas uma amostra com a presença do BSV epissomal e no estado de Santa Catarina cinco amostras com sequências ativas de BSV inseridas no genoma da planta.

## **5. CONCLUSÕES**

- Todas as amostras com genoma B analisadas possui a presença do complexo BSV endógeno inserido no genoma nuclear da planta, sendo prevalente a espécie BSOLV, seguida da espécie BSGFV.
- A ocorrência do BSIMV nas áreas produtoras no Brasil foi observada pela primeira vez.

## REFERÊNCIAS

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

BRIOSO, P.S.T.; CORDEIRO, Z.J.M.; REZENDE, J.A.M.; KITAJIMA, E.W.; PIMENTEL, J.P.; FIGUEIREDO, A.R. Infecção mista em bananeiras pelos vírus do mosaico do pepino ("*Cucumber mosaic virus*" - CMV) e da risca da bananeira ("*Banana Streak virus*" - BSV) no Brasil. **Summa Phytopathologica**, v.26, n.2, p. 254-257, 2000.

CHABANNES, M.; BAURENS, F. C.; DUROY, P. O, BOCS, S.; VERNEREY, M. S.; GOUD, M. R.; BARBE, V.; GAYRAL, P.; ISKRA-CARUANA, M. L. Three infectious viral species lying in wait in the Banana Genome. **Journal of Virology**, v.87,p.862-863, 2013.

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

DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, v.12, p.13-15, 1990.

FAOSTAT- Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). Database (2018). United States: FAO/FAOSTAT. Acesso: 18 de dezembro de 2018.

FIGUEIREDO, D.V.; MEISSNER FILHO, P.E.; SILVA NETO, S.P.; BRIOSO P.S.T. Detection and analysis of Banana streak vírus (BSV) sequences variability of banana from Brazil. **Summa Phytopathologica**, v.32, p. 118-123, 2006.

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

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

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

GAYRAL, P.; BLONDIN, L.; GUIDOLIN, O. Evolution of endogenous sequences of banana streak vírus: what can we learn from banana (*Musa* sp.) evolution? **Journal of Virology**, v.84, n.14, p.7346-7359, 2010.

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

GEERING, A. D.; OLSZEWSKI, N. E.; DAHAL, G.; THOMAS, J. E.; LOCKHART, B. E. L. Analysis of the distribution and structure of integrated Banana streak vírus DNA in a range of *Musa* cultivars. **Molecular Plant Pathology**, v. 2, n. 4, p. 207-213, 2001.

GEERING, A. D. W.; MCMICHAEL, L. A.; DIETZGEN, R. G; THOMAS, J. E. Genetic diversity among Banana streak vírus isolates from Australia. **Phytopathology**, v. 90, n. 8, p. 921-927, 2000.

GREGOR, W.; METTE, M. F.; STAGINNUS, C.; MATZKE, M. A.; MATZKE, A. J. M. A distinct endogenous pararetrovirus family in *Nicotiana tomentosiformis*,

a diploid progenitor of polyploid tobacco. **Plant Physiology**, v.134, p.1191-1199, 2004.

HARPER, G.; DAHAL, G.; THOTTAPPILLY, G.; HULL, R. Detection of episomal Banana Streak Badnavirus by IC-PCR. **Journal of Virological Methods**, v.79, n1, p.1-8, 1999.

ISKRA-CARUANA, M. L.; CHABANNES, M.; DUROY, P. O.; MULLER, E. A possible scenario for the evolution of Banana streak virus in banana. **Virus Research**, v. 186, p. 155-162, 2014.

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

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, n.1, p. 57-62, 2011a.

JAVER-HIGGINSON, E.; ACINA-MAMBOLE, I.; FONT, C.; QUIALA, I.; GONZALEZ, G.; ECHEMENDIA, A. L.; TEYCHENEY, P. Y. Identification of *Banana streak virus* species Goldfinger, Imovè, Mysore and Obino l'Ewai in *Musa* spp. in Cuba. **Plant Pathology**, v. 58, p. 787. 2009.

JAVER-HIGGINSON, E.; ACINA-MAMBOLE, I.; GONZALEZ, E. G.; FONT, C.; GONZÁLEZ, G.; ECHEMENDÍA, A. L.; MULLER, E.; TEYCHENEY, P.Y.; Occurrence, prevalence and molecular diversity of banana streak viruses in Cuba. **European Journal Plant Pathology**. v.138, n.1, p. 157-166, 2014.

KOUADIO, K. T.; DE CLERCK, C.; AGNEROH, T.A.; LASSOIS, L.; PARISI, O.; MASSART, S.; Le POIVRE, P.; JIJAKLI, M.H. Prevalence of viruses infecting

plantain (*Musa* sp., AAB genome) in the major growing regions in Cote d'Ivoire. **African Journal of Agricultural Research**, v.11, n. 44, p. 4532-4541, 2016.

KOUADIO, K.T.; AGNEROH, T.A.; DE CLERCK, C.; LEPOIVRE, P.; JIJAKLI, M.H. First report of Banana mild mosaic virus infecting Plantain in Ivory Coast. **Plant Disease**, v.97, n.5, p.693, 2013.

KUMAR, P.L.; SELVARAJAN, R.; ISKRA-CARUANA, M.L.; CHABANNES, M.; HANNA, R. Biology, etiology and control of virus diseases of banana and plantain. **Advances in Virus Research**, v. 9, p. 229-269. 2014.

MADHULATHA, P.; ANBALAGAN, M.; JAYACHANDARAN, S.; SAKTHIVEL, N. Influence of liquid pulse treatment with growth regulators on in vitro propagation of banana (*Musa* sp. AAA). **Plant Cell Tissue Organ Culture**, v.76, p.189-192,2004.

MATTHIESEN, M. L.; BOTEON, M. **Análise dos principais pólos produtores de banana no Brasil**. Piracicaba (SP): ESALQ,**Hortifruti** / CEPEA. p.18, 2002.

MEYER, J. B.; KASDORF; G. G. F.; NEL; L. H.; PIETERSEN, G. Transmission of activated episomal Banana streak OL (badna) virus (BSOLV) to cv. Williams banana (*Musa* sp.) by three mealybug species. **Plant Disease**, v.92, p. 1158-1163, 2008.

NDOWORA, T.; DAHAL, G.; LAFLEUR, D.; HARPER, G.; HULL, R.; OLSZEWSKI, N.; LOCKHART, B. Evidence that Badnavirus infection in *Musa* can originate from integrated sequences. **Virology**, v.255, p.214-220, 1999.

NDOWORA, T.; LOCKHART, B.E.L. Development of a serological assay detecting serologically diverse Banana streak virus isolates. In: CRAENEN, K.; ORTIZ, R.; KARAMURA, E. B.; VUYLSTEKE, D.(Eds.) Proceedings of the First International Conference on Banana and Plantain for Africa. **Acta Horticulture**, v.540, p.377-388, 2000.

NOUMBISSIE-TOUKO, G.B. **Ségrégation des chromosomes dans un croisement interspécifique de bananiers (AAAB x AA) et redistribution des séquences du Banana streak virus intégrées au génome B.** Tese Biologie Intégrative des Plantes (BIP). Centre International d'Études Supérieures em Sciences Agronomiques de Montpellier. França, 2014.

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

SANT'ANA, M. M. **Ocorrência do Banana Streak vírus (BSV) e do Cucumber mosaic vírus (CMV) em cultivo convencional e orgânico de bananeiras (*Musa spp.*) no Vale do Ribeira.** p. 83. Dissertação (Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio). Instituto Biológico, da Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios. São Paulo, p. 83, 2013.

SILVA, S. O.; MATOS, A. P.; ALVES, E.J. Melhoramento genético da bananeira. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 33, n. 5, p. 693-703, 1998.

SILVA, S. O.; SHEPHERD, K.; ALVES, E.J.; DANTAS, J.L.L. Cultivares de banana. In: ALVES, E.J. A cultura da banana: aspectos técnicos, socioeconômicos e agroindustriais. Brasília: **EMBRAPA-SPI**, p. 85-105, 1999.

SILVA, S.O.; GASPAROTTO, L.; MATOS, A.P.; CORDEIRO, Z.J.M.; FERREIRA, C.F.; RAMOS, M.M.; JESUS, O.N. **Programa de Melhoramento de Bananeira no Brasil - Resultados Recentes.** Cruz das Almas, Embrapa Mandioca e Fruticultura. p.36, 2003 (Documentos, 123).

SILVEIRA, D. G.; MEISSNER FILHO, P. E.; SOARES, T. M.; SANCHES, N. F.; FIGUEIREDO, D. V.; BRIOSO, P. S. T. Indexação biológica de genótipos de bananeira para o Banana Streak vírus. **Summa Phytopathologica**, v.34, n.2, p.172-174, 2008.

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

STAGINNUS, C.; GREGOR, W.; METTE, M.F.; TEO, C.H.; BORROTO-FERNÁNDEZ, E.G.; MACHADO, M. L.; MATZKE M.; SCHWARZACHER T. Endogenous pararetroviral sequences in tomato (*Solanum lycopersicum*) and related species. **BMC Plant Biology**, v. 7, n. 24, p. 1-16, 2007.

STAGINNUS, C.; ISKRA-CARUANA, M. L.; LOCKHART, B.; HOHN, T.; RICHERT-POGGELER, K. R. Suggestions for a nomenclature of endogenous pararetroviral sequences in plants. **Archives of Virology**, v. 154, n. 7, p. 1189-1193, 2009.

SU, L. S.; GAO, S.; HUANG, Y.; WANG, D.; MA, Y.; FANG, R.; CHEN, X. Complete genomic sequence of Dracena mottle vírus, a distinct Badnavírus. **Vírus Genes**, v. 35, n. 2, p. 423-429, 2007.



**Detecção de fragmentos infecciosos de eBSV com *primers* alelicos espécie-específicos em genótipos comerciais de banana e diploides BB**

## **Detecção de fragmentos infecciosos de eBSV com *primers* alelicos espécie-específicos em genótipos comerciais de banana e diploides BB**

**Resumo-** O vírus das estrias da bananeira (BSV) apresenta as formas endógena e episomal, que podem ser transmitidas e infectivas a depender do hospedeiro e das condições de estresse submetidas. O presente estudo teve como objetivo avaliar a presença de fragmentos infectivos no germoplasma comercial de banana brasileiro, assim como identificar diploides BB livres de fragmentos infecciosos com potencial de uso pelo melhoramento genético. Para tanto, foram coletadas amostras de folhas de híbridos tetraploides de bananeira desenvolvidos pela Embrapa, assim como seus parentais, cultivares comerciais triploides e diploides selvagens BB. Foram utilizados seis iniciadores alélicos espécie-específicos das espécies virais eBSGFV e eBSOLV. A partir das análises das amostras, observou-se que todos os híbridos desenvolvidos pela Embrapa apresentaram o fragmento infectivo GF-7 associado com a espécie BSGFV. Em se tratando da presença do fragmento infectivo OL-1 associado com a espécie BSOLV, apenas a cultivar Thap Maeo mostrou-se positiva. Os outros genótipos amplificaram apenas o fragmento não infectivo OL-2. Também observou-se que todos os oito acessos com genoma BB apresentam tanto o fragmento viral infeccioso OL-1 para a espécie BSOLV, quanto o GF-7 para a espécie viral BSGFV. A análise realizada no germoplasma elite da Embrapa (cultivares e híbridos) é essencial para determinar em que condições e quais cultivares possuem fragmentos infecciosos que podem ser ativados em nível de campo e *in vitro* e assim serem eliminados *a priori* dos cruzamentos e também como fontes de informação quanto ao nível de resistência ao BSV para o programa de melhoramento de banana da Embrapa.

**Palavras-Chave:** fragmento infeccioso, restrição enzimática, eBSOLV, eBSGFV, OL-1, OL-2, GF-7.

**Detection of eBSV infective fragments with fragment species-specific primers in banana commercial genotypes and BB diploids**

**Abstract.** Banana Streak Virus (BSV) has endogenous and episomal forms which can be transmitted and infective depending on the host and stress conditions. The objective of the present work was to evaluate the presence of infective fragments in the commercial germplasm as well as to identify diploids free of infective fragments and with potential for use in the banana genetic breeding program. Leaf samples were collected from tetraploid banana hybrids developed by Embrapa as well as their parents, commercial triploid cultivars and wild BB diploids. Six species-specific fragment primers for eBSGFV and eBSOLV identification were used. All hybrids developed by Embrapa had the infective fragment GF-7 associated with the BSGFV species. As to the infective fragment associated with the BSOLV species, OL-1, only the Thap Maeo cultivar was positive. The other genotypes amplified only the non-infective fragment, OL-2. Also all eight BB accessions had the infective fragment for the BSOLV species, OL-1, as well as the GF-7, for the BSGFV species. The analysis carried out with the elite germplasm at Embrapa (cultivars and hybrids) is essential to determine in which conditions and which cultivars have the infective fragments which can be triggered at field and in vitro level and be eliminated prior to crossings as well as be a source of information regarding the level of BSV resistance in the banana genetic breeding program.

**Key-words:** infective fragments, restriction enzyme, eBSOLV, eBSGFV, OL-1, OL-2, GF-7.

## 1. INTRODUÇÃO

A banana, após o arroz, o trigo, e o milho, é considerada o quarto alimento mais importante do mundo (PERRIER et al., 2011). O Brasil é o quarto produtor mundial da fruta, tendo produzido aproximadamente 7,0 milhões de toneladas em 2016, em uma área aproximada de 470 mil hectares (FAOSTAT, 2018). Nesse mesmo ano, a banana foi o quinto mais importante cultivo agrícola brasileiro, com base no valor bruto de produção, que alcançou 15,0 bilhões de reais anuais, correspondendo a 4,3% da riqueza gerada pela produção agrícola brasileira, reforçando a importância da fruta para o agronegócio nacional (IBGE, 2018).

Como observado para outras espécies, as bananas e os plátanos são atacados por diversos fitopatógenos, entre os quais fungos, nematoides, insetos e vírus (JONES, 2000). Os fungos de maior importância são os agentes causais da Sigatoka-amarela (*Pseudocercospora musae*, Leach), Sigatoka-negra (*Pseudocercospora fijiensis*, Morelet) e murcha de Fusarium (*Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* raças 1, 2 e 4) (BRIOSO et al., 2000). O nematoide que tem causado maiores danos à bananicultura é o *Radopholus similis*; e a broca-do-rizoma (*Cosmopolites sordidus*) é a praga mais importante nas regiões produtoras, em especial de plátanos.

Especificamente se tratando de viroses, as duas mais importantes no país são causadas pelo vírus do mosaico do pepino (CMV) e o vírus das estrias da bananeira (BSV), esse último é caracterizado pela presença de estrias cloróticas descontínuas nas folhas, que progressivamente tornam-se necróticas, levando à senescência prematura da folha e sua morte. Outros sintomas observados são: a má formação dos frutos, a diminuição do número de cachos e de frutos por cacho e em casos mais graves o apodrecimento do pseudocaule levando à morte da planta (SANT'ANA, 2013; NOUMBISSIE-TOUKO, 2014).

A transmissão do BSV pode ocorrer por meio de vetor de transmissão, as cochonilhas (NOUMBISSIE-TOUKO, 2014).

O vírus das estrias da bananeira pode ocorrer em duas formas, epissomal e endógena. Essas formas podem ser transmitidas e infectivas a

dependem do hospedeiro e das condições de estresse (GAYRAL e ISKRA-CARUANA, 2009). As sequências endógenas de BSV (eBSVs) estão presentes no genoma nuclear de *Musa balbisiana* (genoma B) (ISKRA-CARUANA et al., 2010; CHABANNES et al., 2013). Acredita-se que o surgimento da doença causada pelo BSV, em híbridos interespecíficos (AAB e AAAB), pode ser resultado da presença do fragmento infeccioso de eBSVs que possibilita maior probabilidade de causar a doença na planta (GAYRAL et al., 2008; ISKRA-CARUANA et al., 2010). Desta forma, sequências eBSVs podem se tornar patogênicas, em razão de condições específicas de estresse, como por exemplo o déficit hídrico ou dos frequentes subcultivos oriundos da cultura de tecidos. Além disso, processos de hibridação, como os realizados em programas de melhoramento da fruteira, devido à ocorrência de eventos nas sequências integradas, podem resultar na reconstituição e na ativação do genoma do vírus (DALLOT et al., 2001; CÔTE et al., 2010; UMBER et al., 2016). Tais híbridos poderiam promover surtos de BSV após ativação e transmissão por cochonilha, causando sérios danos ao cultivo da bananeira (MEYER et al., 2008).

A Embrapa possui o único programa de melhoramento de bananas e plátanos do Brasil, iniciado em 1982, a partir da criação da sua coleção de germoplasma; produto de coletas nacionais e internacionais. Este programa desenvolveu 11 cultivares por meio de hibridação, além de recomendar aos agricultores cinco cultivares, sendo duas delas, Prata-Anã e Pacovan, as mais cultivadas no Brasil (SILVA et al., 2016). Esses genótipos apresentam características sensoriais e perfil agrônomico que atendem as exigências dos consumidores e produtores, além da resistência a pragas e doenças, tais como as sigatokas amarela e negra e a murcha de *Fusarium* raça 1.

Informações sobre integrações virais e principalmente a presença de formas ativas de BSV no genoma das cultivares desenvolvidas e ou recomendadas pela Embrapa são necessárias para que haja ações de prevenção de surtos da doença em áreas de produção, ou mesmo para novas estratégias de melhoramento genético.

Em anos recentes tem se observado surtos pontuais de BSV em algumas regiões produtoras de banana no Brasil, em especial nas regiões Sul

e Sudeste, onde ocorrem invernos rigorosos, com frequência de temperaturas abaixo dos 15°C, condição que tem potencial de causar estresse na planta e ativar sequência infectivas do vírus, caso presentes no genoma.

O Centro de Cooperação Internacional em Pesquisa Agronômica (CIRAD, Montpellier, França) desenvolveu três classes de *primers* espécie-específicos capazes de identificar as integrações virais e diferenciar as principais espécies do vírus das estrias da bananeira (BSV) comumente encontradas no genoma da banana: *Banana Streak Goldfinger Vírus* (BSGFV), *Banana Streak Obinol'Ewai Vírus* (BSOLV) e *Banana Streak Imovè Vírus* (BSIMV) (CHABANNES et al., 2013). Esse estudo foi realizado a partir da análise de uma população segregante obtida a partir do cruzamento de plantas do diploide do genótipo *Pisang Klutuk Wulung* (BB) com o autotetraploide IDN 110 (AAAA). Além disso, também foram desenvolvidos *primers* capazes de identificar genótipos contendo fragmentos infecciosos para as espécies BSGFV e BSOLV.

Aliado ao desenvolvimento destes *primers* espécie-específicos, foi desenvolvida também uma técnica de indexação baseada na imunocaptura associada com a reação em cadeia da polimerase (IC-PCR + DNase), no qual o uso da enzima DNase auxilia na degradação de DNA genômico da planta evitando, portanto, resultados falso-positivos.

Estas abordagens metodológicas são potencialmente eficientes, pois permitem conhecer a diversidade das espécies de BSV, assim como identificar a presença de sequências virais ativas nos genótipos avaliados. Sendo assim, o objetivo desse trabalho é avaliar os híbridos e cultivares lançadas pela Embrapa e em uso pelos agricultores brasileiros no que diz respeito à presença de sequências integradas do vírus das estrias da bananeira (BSV), por meio de *primers* espécie-específicos e IC-PCR + DNase, assim como identificar a presença de fragmentos infecciosos nesses genótipos.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1. Material vegetal**

Foram utilizadas amostras de folhas jovens de híbridos e cultivares lançadas pela Embrapa, seus parentais e diploides com genoma BB (Tabela 1).

**Tabela 1.** Híbridos desenvolvidos pela Embrapa, cultivares, parentais e diploides com genoma BB indexados quanto a presença de espécies do vírus das estrias da bananeira (BSV), utilizando a técnica IC-PCR+DNase. Embrapa 2019.

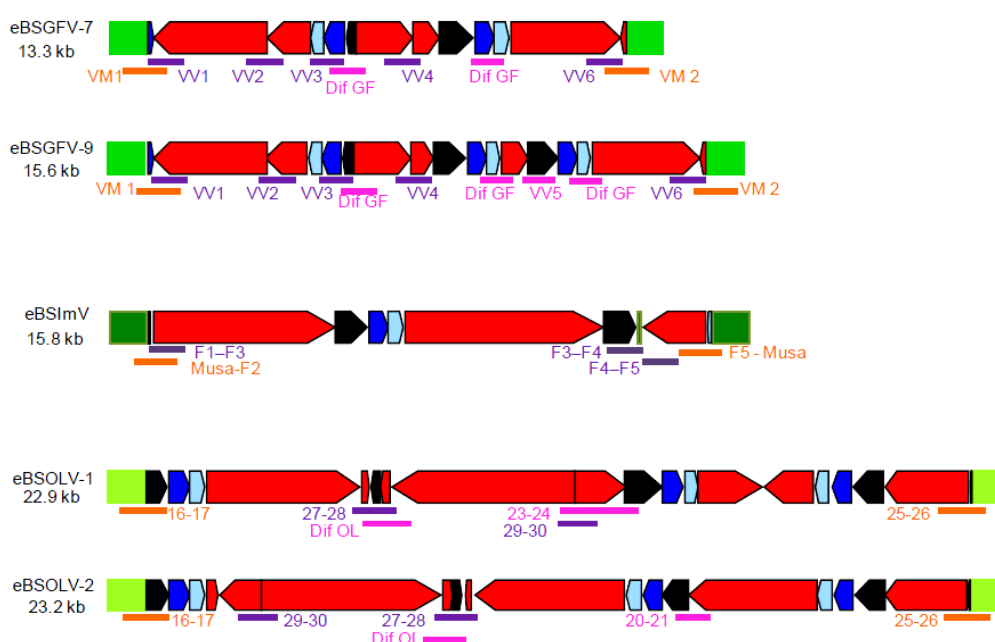
BGB	Híbridos desenvolvidos pela Embrapa		
BGB 229	BRS Pioneira (Prata Anã x Pisang Lilin)	Prata	AAAB
BGB 198	BRS Pacovan Ken (Pacovan x M53)	Prata	AAAB
BGB 221	BRS Platina (Prata Anã x M53)	Prata	AAAB
BGB 231	BRS Garantida (Prata São Tomé x M53)	Prata	AAAB
BGB 226	BRS Japira (Pacovan x M53)	Prata	AAAB
BGB 240	BRS Vitoria (Pacovan x M53)	Prata	AAAB
BGB 243	BRS Princesa (Yangambi nº2 x M53)	Maçã	AAAB
BGB 238	BRS Preciosa (Pacovan x M53)	Prata	AAAB
BGB 277	BRS Tropical (Yangambi nº2 x M53)	Maçã	AAAB
BGB 321	BRS Caprichosa (Prata Comum x M53)	Prata	AAAB
BGB 211	BRS Pacoua (Pacovan x Calcutta 4)	Prata	AAAB
Cultivares recomendadas pela Embrapa			
BGB 104	BRS Belluna	-	AAA
BGB 127	BRS Caipira	Ibota	AAA
BGB 138	BRS Thap Maeo	-	AAB
Parentais dos híbridos desenvolvidos pela Embrapa			
BGB 203	Pacovan	Prata	AAB
BGB 213	Prata Comum	Prata	AAB
BGB 121	Yangambi nº2	Maçã	AAB
BGB 206	Prata Anã	Prata	AAB
BGB 108	São Tomé	Prata	AAB
BGB 006	M53	Diploide	AA
BGB 025	Pisang Lilin	Diploide	AA
BGB 010	Calcutta 4	Diploide	AA
Diploides com genoma BB			
BGB 301	Monthan		
BGB 076	Musa Balbisiana		
BGB 073	BB Panamá		
BGB 058	BB França		
BGB 059	Butuhan		
BGB 061	Diploide da Bélgica		
BGB 074	Balbisiana Franca		
BGB 056	BB IAC		

BGB: código utilizado pelo programa de melhoramento genético de banana da Embrapa.

## 2.2. Descrição dos *primers* espécie-específicos

Para a avaliação da presença de fragmentos infectivos no germoplasma comercial de banana brasileiro foram utilizados seis *primers* alélicos espécie-específicos das espécies virais BSGFV (*Banana Streak Goldfinger Vírus*) e BSOLV (*Banana Streak Obinol'Ewai Vírus*) (Tabela suplementar 2 e Figura 1).

Esses iniciadores distinguem os fragmentos virais infecciosos: *Endogenous Banana Streak Goldfinger Vírus* eBSGFV-7 (GF-7) e eBSOLV-1 (OL-1) dos fragmentos virais não-infecciosos: eBSGFV-9 (GF-9) e *Endogenous Banana Streak Obinol'Ewai Vírus* BSOLV-2 (OL-2) (NOUMBISSIE-TOUKO, 2014). Os fragmentos da espécie viral eBSIMV não podem ser diferenciados, uma vez que os dois fragmentos são estruturalmente idênticos (CHABANNES et al., 2013).



**Figura 1.** Representação do genoma de três espécies do vírus das estrias da banana e delimitação dos diferentes primers espécie-específicos para BSGFV, BSIMV e BSOLV, respectivamente. Os pentágonos nas cores azul escuro, azul claro e vermelho, representam as ORFs 1, 2 e 3 no genoma viral. O retângulo verde representa o genoma da banana. Os traços na cor laranja representam os iniciadores de junção; os iniciadores internos/estruturais estão representados pela cor roxa. A cor rosa representa os iniciadores alelicos. Em preto estão representadas as regiões intergênicas. Fonte: NOUMBISSIE-TOUKO (2014).

### 2.3. Detecção de fragmentos infecciosos com iniciadores alelicos espécie-específicos

Após as reações de PCR com os *primers* alélicos os produtos obtidos foram digeridos com as enzimas de restrição: Hae III (New England Biolabs) e Taa1-HpyCH4III (Fermentas) para as espécies BSOLV e BSGFV,



respectivamente (CHABANNES et al., 2013), de acordo com as instruções dos fabricantes.

O DNA digerido foi separado em gel de agarose 2,5% em tampão TBE 0.5X e corado com brometo de etídio ( $0,5 \mu\text{l mL}^{-1}$ ). Os fragmentos gerados foram fotografados utilizando fotodocumentador Gel Logic 2200 Pro e analisados conforme padrões de bandas esperados para *primers* específicos (CHABANNES et al., 2013; GAYRAL e ISKRA-CARUANA, 2009) baseados em padrão molecular de 100pb (DNA Ladder Biolabs).

Foram utilizadas as seguintes métodos e que estão descritos no capítulo 1 desse documento: para detecção do eBSV (coleta das amostras; extração, quantificação e ajuste da concentração das amostras, PCR multiplex com primers espécies-específicos e da região conservada do DNA da bananeira (25S), eletroforese em gel de agarose); para identificação alélica (PCR, restrição enzimática, e eletroforese em gel de agarose).

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

De acordo com os resultados, todos os híbridos desenvolvidos pela Embrapa possuem DNA endógeno de BSGFV e BSOLV. No que diz respeito às cultivares, apenas a cultivar Thap Maeo (AAB) apresentou resultados positivo para BSOLV (Tabela 2).

Os cinco parentais femininos dos híbridos desenvolvidos pela Embrapa (Prata comum, Pacovan, Yangambi nº2, São Tomé e Prata-Anã) apresentaram sequências para BSV endógeno, enquanto os parentais masculinos (M53, Pisang Lilin e Calcutta 4), por se tratarem de diploides com genoma AA não apresentaram a presença de eBSV para as espécies virais BSOLV, BSGFV e BSIMV, o que era esperado uma vez que essas espécies virais se encontram integradas apenas no genoma B de *M. balbisiana*. É importante destacar que as cultivares Prata-Anã e Pacovan, indicadas como parentais femininos dos híbridos desenvolvidos pela Embrapa, são as cultivares mais utilizadas pelos agricultores brasileiros. Segundo Le PROVOST et al. (2006) sequências de várias espécies de eBSV estão de fato presentes no genoma B de *M. balbisiana*, mas não no genoma A (Tabela 2).

**Tabela 2.** Integrações virais de espécies do vírus das estrias da bananeira (BSV) em híbridos de bananeira desenvolvidos pela Embrapa, seus parentais, assim como cultivares recomendadas, utilizando *primers* alélicos espécie-específicos. Embrapa 2019.

Cod. BGB	Genótipos	BSGFV			BSOLV		
		Endógenos			Endógenos		
		VV5	DifGF Taal	Marker2 BSOLV 2	Marker2 BSOLV 1	DifOL HaeIII	DifOL AhdI
Híbridos desenvolvidos pela Embrapa							
BGB 229	BRS Pioneira	1	1	1	1	1	1
BGB 198	BRS Pacovan Ken	1	1	1	1	1	1
BGB 221	BRS Platina	1	1	1	1	1	1
BGB 231	BRS Garantida	1	1	1	1	1	1
BGB 226	BRS Japira	1	1	1	1	1	1
BGB 240	BRS Vitoria	1	1	1	1	1	1
BGB 243	BRS Princesa	1	1	1	1	1	1
BGB 238	BRS Preciosa	1	1	1	1	1	1
BGB 277	BRS Tropical	1	1	1	1	1	1
BGB 321	BRS Caprichosa	1	1	1	1	1	1
BGB211	BRS Pacoua	1	1	1	1	1	1
Cultivares recomendadas pela Embrapa							
BGB 104	BRS Belluna	0	0	0	0	0	0
BGB 127	BRS Caipira	0	0	0	0	0	0
BGB 138	BRS Thap Maeo	0	0	1	0	1	1
Parentais dos híbridos desenvolvidos pela Embrapa							
BGB 203	Pacovan	1	1	1	1	1	1
BGB 213	Prata comum	1	1	1	1	1	1
BGB 121	Yangambi nº2	0	0	1	1	1	1
BGB 206	Prata Anã	1	1	1	1	1	1
BGB 108	São Tomé	0	0	0	0	0	0
BGB 006	M53	0	0	0	0	0	0
BGB 025	Pisang Lilin	0	0	0	0	0	0
BGB 010	Calcutta 4	0	0	0	0	0	0

DifGF Taal= enzima de restrição para o *primer* BSGFV (*Banana Streak Goldfinger Vírus*) e DifOL HaeIII e Ahd1 = enzimas de restrição para o *primer* BSOLV (*Banana Streak Obinol'Ewai Vírus*).

Os genótipos com a confirmação da presença do BSV endógeno foram analisados a partir do uso de enzimas de restrição específicas capazes de identificar fragmentos infectivos de BSGFV e BSOLV.

A partir dos resultados apresentados na Tabela 3 é possível observar que todos os híbridos desenvolvidos pela Embrapa apresentaram o fragmento infectivo GF-7 associado com a espécie BSGFV. Também foi observado neste

trabalho, a presença do fragmento não infeccioso (GF-9) em todos os híbridos e cultivares analisados. Resultados semelhantes foram observados onde híbridos interespecíficos de bananeiras e plátanos, conservados em coleções de germoplasma e ou cultivados em Cuba, apresentaram apenas o fragmento infeccioso (GF-7) (JAVER-HIGGINSON et al., 2015). Ainda, segundo os autores, todos os genótipos com duas cópias do genoma de *M. balbisiana* (ABB, AABB), exibiram fragmentos infecciosos (GF-7) e não infecciosos (GF-9), com eBSGFV. Supõe-se que a presença de ambos fragmentos poderia ser oriunda de diploides de *M. balbisiana* que possuem BSGFVs integradas ao genoma (CHABANNES et al., 2013; DUROY, 2012).

Em se tratando da presença do fragmento infeccioso associado com a espécie eBSOLV (OL-1), apenas a cultivar Thap Maeo mostrou-se positiva. Os demais genótipos amplificaram apenas o fragmento não infectivo OL-2 (Tabela 3).

Estes resultados mostram que os híbridos desenvolvidos pela Embrapa estão livres de fragmentos infectivos OL-1 da espécie BSOLV. Estudos realizados em Cuba, analisando híbridos e cultivares de bananeiras mostraram que a maioria das amostras contendo duas cópias do genoma de *M. balbisiana* eram homozigóticas para o fragmento não infeccioso OL-2 (JAVER-HIGGINSON et al., 2015). Sendo assim, uma possível explicação para presença ou do fragmento infeccioso ou do fragmento não infeccioso nas plantas, é que estas amostras, por carregarem apenas uma cópia do genoma de *M. balbisiana*, devem apresentar um fragmento eBSOLV (JAVER-HIGGINSON et al., 2015; CHABANNES et al., 2013; DUROY, 2012).

Alguns estudos relatam que a presença de fragmentos de eBSV infecciosos na planta, quando esta é submetida a algum tipo de estresses abióticos ou bióticos, podem liberar sequencias virais completas do vírus, levando a infecções em plantas com o genoma AB, AAB e híbridos AAAB (DALLOT et al., 2001; CÔTE et al., 2010; ISKRA-CARUANA et al., 2010; CHABANNES e ISKRA-CARUANA, 2013).

**Tabela 3.** Resultado do PCR utilizando primers alélicos específicos de BSGFV e BSOLV e digestão com enzimas emTaalI e HaeIII, respectivamente dos híbridos de bananeira desenvolvidos pela Embrapa, seus parentais, assim como cultivares recomendadas. Embrapa 2019.

Cod. BGB	Genótipos	BSGFV		BSOLV	
		Alélicos			
		GF-7	GF-9	OL-1	OL-2
Híbridos desenvolvidos pela Embrapa					
BGB 229	BRS Pioneira	1	1	0	1
BGB 198	BRS Pacovan Ken	1	1	0	1
BGB 221	BRS Platina	1	1	0	1
BGB 231	BRS Garantida	1	1	0	1
BGB 226	BRS Japira	1	1	0	1
BGB 240	BRS Vitoria	1	1	0	1
BGB 243	BRS Princesa	1	1	0	1
BGB 238	BRS Preciosa	1	1	0	1
BGB 277	BRS Tropical	1	1	0	1
BGB 321	BRS Caprichosa	1	1	0	1
BGB211	BRS Pacoua	1	1	0	1
Cultivares recomendadas pela Embrapa					
BGB 138	BRS Thap Maeo	0	0	1	0
Parentais dos híbridos desenvolvidos pela Embrapa					
BGB 203	Pacovan	1	1	0	1
BGB 213	Prata comum	1	1	0	1
BGB 121	Yangambi nº2	1	1	0	1
BGB 206	Prata Anã	1	1	0	1

(0)ausência do fragmento infeccioso e (1) presença do fragmento infeccioso. GF =BSGFV; OL = BSOLV; GF-7 = eBSGFV-7 (fragmento infeccioso); GF-9 = eBSGFV-9 (fragmento não infeccioso); OL-1 = eBSOLV-1 (fragmento infeccioso); OL-2 = eBSOLV-2 (fragmento não infeccioso).

### 3.1. Detecção do fragmento infeccioso do BSV em acessos com genoma BB

Considerando o uso de diploides BB em cruzamentos, fez-se a análise dos mesmos visando a identificação de fragmentos infecciosos das espécies BSOLV e BSGFV. Observou-se que todos os oito acessos BBs apresentam tanto o fragmento viral infeccioso OL-1 para a espécie BSOLV, quanto o fragmento infeccioso GF-7 para BSGFV. Logo, todas as amostras de bananeira com genoma B analisadas apresentam os dois fragmentos infecciosos

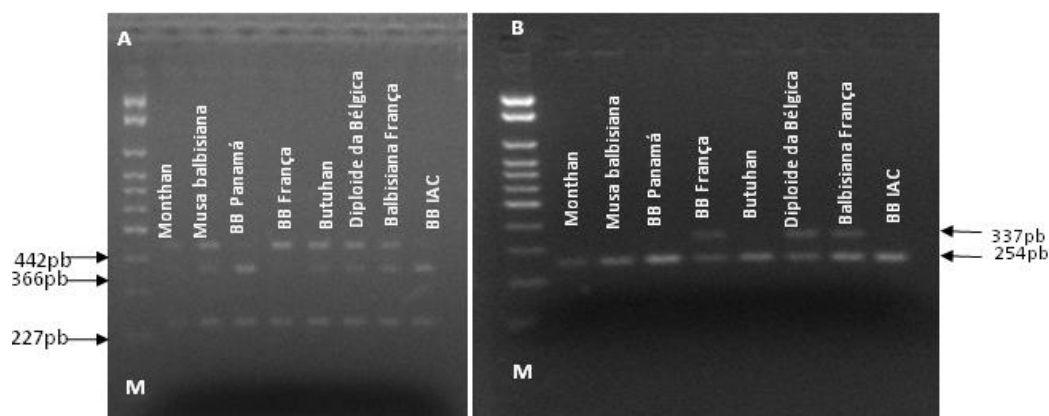
inseridos em seus genomas (Tabela 4 e Figura 2). Estudos mostram que o modelo diploide de *M. balbisiana* "Pisang Klutuk Wulung" (PKW) contém sequências infecciosas de eBSV de três espécies BSOLV, BSGFV e BSIMV (GAYRAL et al., 2008; CHABANNES et al., 2013). A partir da análise de segregação do cruzamento entre "Pisang Klutuk Wulung" (PKW) (BB) x IDN 110 (AAAA) foi possível mostrar que eBSOLV e eBSGFV, possuem dois fragmentos distintos e apenas um é infeccioso, enquanto BSIMV possui dois fragmentos estruturalmente idênticos, sendo ambos considerados infecciosos (CHABANNES et al., 2013).

**Tabela 4.** Resultados das análises utilizando *primers* alélicos espécie-específicos de BSV dos oito acessos do grupo genômico BB pertencentes à coleção de germoplasma da Embrapa. Embrapa 2019.

Diploides	Primers						
	Endógenos			Alélicos			
	GF	OL	IM	GF-7	GF-9	OL-1	OL-2
Monthan	1	1	1	1	1	1	0
Musa balbisiana	1	1	1	1	1	1	0
BB Panamá	1	1	1	1	1	1	0
BB França	1	1	0	1	1	1	1
Butuhan	1	1	1	1	1	1	0
Diploide da Bélgica	1	1	1	1	1	1	1
Balbisiana Franca	1	1	1	1	1	1	1
BB IAC	1	1	1	1	0	1	0

\*GF = BSGFV; OL = BSOLV; IM = BSIMV; GF-7 = eBSGFV-7 (fragmento infeccioso); GF-9 = eBSGFV-9; OL-1 = eBSOLV-1 (fragmento infeccioso); OL-2 = eBSOLV-2. (1 e 0) presença ou ausência do fragmento respectivamente.

Nossos resultados corroboram com a literatura, uma vez que o genoma B em *Musa* spp. contém sequências endógenas de BSV (eBSV), fato que pode levar a infecções espontâneas a partir da liberação das partículas virais por estresses bióticos ou abióticos, tais como a propagação *in vitro* ou mesmo cruzamentos interespecíficos via melhoramento genético (CHABANNES et al., 2013; DUROY, 2012; DUROY et al., 2016; CÔTE et al., 2010; DALLOT et al., 2001). No entanto, é necessário que o genoma B de banana esteja isento das sequências ativas de eBSV.



**Figura 2.** Perfil eletroforético de oito acessos do grupo genômico BB analisados com *primers* alélicos espécies-específicos e clivados com enzimas de restrição: (A) primer DifGF - Taal (específico para BSGFV) que amplifica três fragmentos (227pb, 366pb e 442pb). A presença dos três fragmentos indica que o acesso em questão apresenta os dois fragmentos virais da espécie BSGFV; presença dos fragmentos 227pb e 366pb refere-se ao fragmento viral infeccioso (GF-7) e a presença dos fragmentos de 227pb e 442pb refere-se ao fragmento viral GF-9, não-infeccioso; (B) Dif-OL -Hae III (específico para BSOLV) gerando 2 fragmentos eletroforéticos, um de 337pb referente ao fragmento não infeccioso (OL-2) e um de 254pb, referente ao fragmento infeccioso OL-1. (M) marcador de 100pb.

A tecnologia CRISPR/Cas9 mostrou-se eficiente como ferramenta para eliminar o eBSV integrado no genoma por meio da edição do genoma (TRIPATHI et al., 2019). Esse trabalho abre novas possibilidades para o melhoramento genético de bananeira, no sentido de desenvolver híbridos livres de sequências ativas do eBSV.

Alguns autores afirmam que o surgimento de sintomas de BSV em genótipos AAB ou AAAB pode ser resultado da presença do eBSV infeccioso (GAYRAL et al., 2008; ISKRA-CARUANA et al., 2010). A presença de sequências endógenas de BSV na planta podem se tornar patogênicas sob condições de estresses bióticos ou abióticos, como o causado pelo cultivo *in vitro*, o déficit hídrico e os processos de hibridação, devido à ocorrência de eventos nas sequências integradas que resultam na reconstituição e na ativação do genoma do vírus na planta (COTE et al., 2010; DALLLOT et al., 2001; NDOWORA et al., 1999). Também, segundo os mesmos autores o aparecimento ou não da doença pode estar sendo regulado por modificações epigenéticas que ocorrem durante a hibridização do genoma parental.

A presença de fragmentos de eBSV infecciosos por estresses abióticos ou bióticos, pode liberar sequências virais completas de BSV, levando a infecções em plantas com o genoma AB, AAB e híbridos (DALLOT et al., 2001; CÔTE et al., 2010; ISKRA-CARUANA et al., 2010; CHABANNES e ISKRA-CARUANA 2013). Portanto, a utilização de marcadores que permitam a discriminação de fragmentos infecciosos e fragmentos não-infecciosos do eBSV é de suma importância.

Nosso estudo sobre a presença de integrações virais infecciosas permitiu distinguir os fragmentos virais infecciosos e não infecciosos entre híbridos, genitores e cultivares recomendadas pela Embrapa, assim como entre diploides com genoma BB.

#### **4. CONCLUSÃO**

Os híbridos de bananeira desenvolvidos pelo programa de melhoramento da Embrapa são portadores das espécies virais BSGFV e ou BSOLV endógenas (eBSV).

Todos os híbridos possuem os fragmentos infecciosos GF-7 no seu genoma e estão livres do fragmento infeccioso OL-1.

Apenas a cultivar Thap Maeo, recomendada pela Embrapa, possui eBSV assim como o fragmento infeccioso OL-1 para a espécie viral BSOLV em seu genoma.

Todos os diploides AA utilizados como parentais masculinos dos híbridos desenvolvidos pela Embrapa não apresentam nenhuma das três espécies de eBSV nos seus respectivos genomas.

Todos os oito diploides BBs pertencentes a coleção de germoplasma da Embrapa apresentam ambos os fragmentos infecciosos para as espécies BSGFV (GF-7) e BSOLV (OL-1).

## REFERÊNCIAS

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 estria da bananeira (*Banana streak virus* - BSV) no Brasil. **Summa Phytopathologica**, v. 26, n. 2, p. 254 - 257, 2000.

CHABANNES, M.; BAURENS, F. C.; DUROY, P. O.; BOCS, S.; VERNEREY, M. S.; GOUD, M. R.; BARBE, V.; GAYRAL, P.; ISKRA-CARUANA, M. L. Three infectious viral species lying in wait in the Banana Genome. **Journal of Virology**, v.87,p.862-863, 2013.

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

CÔTE, F. X.; GALZI, S.; FOLLIOU, M.; LAMAGNÈRE, Y.; TEYCHENEY, P.Y.; ISKRA-CARUANA, M.L. Micropropagation by tissue culture triggers differential expression of infectious endogenous *Banana streak virus* sequences (eBSV) present in the B genome of natural and synthetic interspecific banana plantains. **Molecular Plant Pathology**, v.1, p. 137-144, 2010.

DALLOT, S.; ACUNA, P.; RIVERA, C.; RAMIREZ, P.; COTE, F.; LOCKHART, B. E. L.; ISKRA-CARUANA, M. L. Evidence that the proliferation stage of micropropagation procedure is determinant in the expression of Banana streak vírus integrated into the genome of the FHIA 21 hybrid (*Musa* AAAB). **Archives of Virology** v.146, p.2179–2190, 2001.

DUROY, P. O.; PERRIER, X.; LABOUREAU, N.; JACQUEMOUD-COLLET, J. P.; ISKRA-CARUANA, M. L. How endogenous plant pararetroviruses shed light on *Musa* evolution. **Annals of Botanic**, v. 117, n. 4, p. 625-641, 2016.



DUROY, P.O. **What are the deals during the evolution resulting in the preservation of vírus in the genome of plants?** PhD Thesis in Plant integrated biology, Doctoral school of SIBAGNHE, University of Montpellier II Sciences and Techniques of Languedoc, Montpellier, p. 209, 2012.

FAOSTAT – **Food and Agriculture Organization of the United Nations Statistics**. Disponível em <http://www.fao.org/faostat/en#home> Acesso; 18/12/2018.

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

GAYRAL, P.; NOA-CARRAZANA, J. C.; LESCOT, M.; LHEUREUX, F.; LOCKHART, B. E.; MATSUMOTO, T.; PIFFANELLI, P.; ISKRA-CARUANA, M.L. A Single Banana Streak Vírus Integration Event in the Banana Genome as the Origin of Infectious Endogenous Pararetrovírus. **Journal of Virology**. v. 82, n. 13, p. 6697-6711, 2008.

IBGE. **Sistema de Recuperação Automática** (2018). Disponível em: <https://sidra.ibge.gov.br/tabela/1618#resultado>. Acesso em 18/12/2018.

ISKRA-CARUANA, M. L.; CHABANNES, M.; DUROY, P. O.; MULLER, E. A possible scenario for the evolution of Banana streak vírus in banana. **Vírus Research**, v. 186, p. 155-162, 2014.

ISKRA-CARUANA, M.L.; BAURENS, F.C.; GAYRAL, P.; CHABANNES, M. A four-partnerplant-vírus interaction: enemies can also come from within. **Molecular Plant Microbe Interaction**, v.23, n.11, p.1394-1402, 2010.

JAVIER-HIGGINSON, E.; GONZÁLEZ-RAMÍREZ, J.E.; TEYCHENEY, P. Y. Caracterización molecular de secuencias endógenas infecciosas de Banana

streak virus (eBSVs) en cultivares interespecíficos e híbridos de bananos y plátanos cultivados en Cuba. **Fitosanidad**, v. 19, n. 3, p. 233-241, 2015.

Le PROVOST, G.; ISKRA-CARUANA, M. L.; ANINA, I.; TEYCHENEY, P. Y. Improved detection of episomal *Banana streak viroses* by multiplex immunocapture PCR. **Journal of Virological Methods**, 137, p. 7-13, 2006.

JONES, D. R. Introduction to banana, abaca and Enset. In: Jones, D. R. (ed) **Diseases of Banana, Abaca and Enset**. Oxon, United Kingdom: Cabi Publications, 2000. p. 1-38.

MEYER, J. B.; KASDORF, G. G. F.; NEL, L. H.; PIETERSEN, G. Transmission of activated-episomal *Banana streak OL* Badnavirus (BSOLV) to cv. Williams banana (*Musa* sp.) by three mealybug species. **Plant Disease**, v.92, p. 1158-1163, 2008.

NDOWORA T.; DAHAL G.; LAFLEUR, D.; HARPER G.; HULL, R.; OLSZEWSKI, N.; LOCKHART B. Evidence that Badnavirus infection in *Musa* can originate from integrated sequences. **Virology**, v.255,p. 214-220, 1999.

NOUMBISSIE-TOUKO G.B. **Ségrégation de schromosomes dans um croisement interspécifique de bananiers (AAAB x AA) et redistribution des sequences du Banana streak virus intégrées augénome B**. Tese (Biologie Intégrative des Plantes (BIP). Centre International d'Études Supérieures em Sciences Agronomiques de Montpellier. França, 2014.

PERRIER, X.; DE LANGUE, E.; DONOHUE, M.; LENTFER, C.; VRYDAGHS, L.; BAKRY, F.; CARREEL, F.; HIPPOLYTE, I.; HORRY, J. P.; JENNY, C.; LEBOT, V.; RISTERUCCI, A. M.; TOMKPE, K.; DOUTRELEPONT, H.; BALL, T.; MANWARING, J.; DE MARET, P.; DENHAM, T. Multidisciplinary perspectives on banana (*Musa* spp.) domestication. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, n. 28, p. 11311-11318, 2011.

SANT'ANNA, M. M. **Ocorrência do Banana Streak vírus (BSV) e do Cucumber mosaic vírus (CMV) em cultivo convencional e orgânico de bananeiras (*Musa spp.*) no Vale do Ribeira.** p. 83. Dissertação (Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio). Instituto Biológico, da Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios. São Paulo, 2013.

SILVA, S. O.; AMORIM, E. P.; SANTOS-SEREJO, J. A.; BORGES, A. L. Cultivares. In: FERREIRA, C. F.; SILVA, S. O.; AMORIM, E. P.; SANTOS-SEREJO, J. A. (1ª Ed.). **O agronegócio da banana**, Brasília, DF: Embrapa, p. 111-136, 2016.

TRIPATHI, J. N.; NTUI, V. O.; RON, M.; MUIRURI, S. K.; BRITT, A.; TRIPATHI, L. CRISPR/Cas9 editing of endogenous *banana streak vírus* in the B genome of *Musa spp.* Overcomes a major challenge in banana breeding. **Communications Biology**, v. 2, n. 1, p. 46, 2019.

UMBER, M.; PICHAUT J. P.; FARINAS, B.; LABOUREAU, N.; JANZAC, B.; PINEAU, K.; PRESSAT, G.; BAURENS, F. C.; CHABANES, M.; DUROY, P. O.; DELOS, J. M.; JENNY, C.; ISKRA-CARUANA, M. L.; SALMON, F.; TEYCHENEY, P. Y. Marker-assisted breeding of *Musa balbisiana* genitors devoid of infectious endogenous Banana streak vírus sequences. **Molecular Breeding**, v.3, p.74, 2016.

**Tabela Suplementar 1.** Acessos do banco de germoplasma da Embrapa utilizados na identificação de espécies virais de BSV por meio de primers espécie-específicos. Embrapa 2019.

Código BGB	Nome	Ploidia	Tipo/subgrupo	Código BGB	Nome	Ploidia	Tipo/subgrupo
BGB301	Monthan	BB	Diploide selvagem/ <i>M. balbisiana</i>	BGB 047	Pisang Nangka	AA	-
BGB076	<i>Musa balbisiana</i>	BB	Diploide selvagem/ <i>M. balbisiana</i>	BGB 039	PA Musore 2	AA	-
BGB073	BB Panamá	BB	Diploide selvagem/ <i>M. balbisiana</i>	BGB 032	Mambee Thu	AA	-
BGB058	BB França	BB	Diploide selvagem/ <i>M. balbisiana</i>	BGB 035	Niyarma Yik	AA	<i>ssp. Banksii</i>
BGB059	Butuhan	BB	Diploide selvagem/ <i>M. balbisiana</i>	BGB 027	Microcarpa	AA	<i>ssp. Banksii</i>
BGB 061	Diploide da Bélgica	BB	Diploide selvagem/ <i>M. balbisiana</i>	BGB 023	S/N 2	AA	<i>ssp. Microcarpa</i>
BGB 074	Balbisiana Franca	BB	Diploide selvagem/ <i>M. balbisiana</i>	BGB 025	Pisang Lidi	AA	<i>ssp. Banksii</i>
BGB 056	BB IAC	BB	Diploide selvagem/ <i>M. balbisiana</i>	BGB 055	F2P2	AA	-
BGB248	Curare Enano	AAB	Plátanos	BGB 010	Calcutta 4	AA	-
BGB254	Terra Sem Nome	AAB	Plátanos	BGB 014	PA Rayong	AA	-
BGB250	Red Yad	AAB	Plátanos	BGB 008	Pisang Jaran	AA	-
BGB257	Tipo Velhaca	AAB	Plátanos	BGB 012	Nº 118	AA	<i>ssp. Burmannica</i>
BGB255	Terra Ponta Aparada	AAB	Plátanos	BGB 065	Pisang Cici	AA	-
BGB256	Pinha	AAB	Plátanos	BGB 007	PA Musore 3	AA	-
BGB258	Chifre de Vaca	AAB	Plátanos	BGB 017	Pisang Perak	AA	-
BGB253	Mongolo	AAB	Plátanos	BGB 043	Pisang Jari Buaya	AA	-
BGB260	Terra Maranhão	AAB	Plátanos	BGB 018	Buitenzorg	AA	-
BGB 252	D' Angola	AAB	Plátanos	BGB 005	028003-01	AA	-
BGB 249	Samura B	AAB	Plátanos	BGB 031	Borneo	AA	-
BGB 261	Trois Vert	AAB	Plátanos	BGB 006	M53	AA	<i>ssp. Microcarpa</i>
BGB 259	Comprida	AAB	Plátanos	BGB 011	Burmannica	AA	Híbrido
BGB 251	Terra Anã Branca	AAB	Plátanos	BGB 051	Selangor	AA	-
BGB 246	Terrinha	AAB	Plátanos	BGB 050	M-61	AA	<i>ssp. Malaccensis</i>
BGB 135	Mysore	AAB	Mysore	BGB 016	Zebrina	AA	Híbrido
BGB 162	Macaubal "A"	AAB	-	BGB 042	Pisang Rojo Uter	AA	<i>ssp. zebrina</i>
BGB 170	Prata Anã Taperão	AAB	Prata/ Pome (prata)	BGB 021	SA	AA	-
BGB 178	Prata Anã 3	AAB	Prata	BGB 002	Monyet	AA	-
BGB 177	Prata Maceió	AAB	Prata	BGB 048	Tjau Lagada	AA	<i>ssp. zebrina</i>
BGB143	Poovan	AAB	Maçã(Silk) Mysore	BGB 033	FakoFako	AA	<i>ssp. microcarpa</i>
BGB168	Prata Anã Rene	AAB	Prata/Pome	BGB 036	PA Abyssinea	AA	-
BGB146	Pisang Kelat	AAB	-	BGB 037	Malaccensis	AA	<i>ssp. Siamea</i>

**Tabela Suplementar 1.** Acessos do banco de germoplasma da Embrapa utilizados na identificação de espécies virais de BSV por meio de primers espécie-específicos. Embrapa 2019. Continuação.....

BGB 133	Pulut	AAB	-	BGB 041	SF-751	AA	<i>ssp. Malaccensis</i>
BGB 159	Prata Anã Branca	AAB	Prata/pome	BGB 026	Khai Nai On	AA	-
BGB 166	Prata Anã Batico	AAB	Prata/pome	BGB 030	Khi Maeo	AA	-
BGB 141	Tip Khan	AAB	-	BGB 022	NBA-14	AA	-
BGB 137	Moenang	AAB	-	BGB 029	Pisang Berlin	AA	<i>ssp. Banksii</i>
BGB 171	Prata Jussara IAC	AAB	Prata/pome	BGB 024	Baby Yadefana	AA	-
BGB 173	Pisang KepokBung	AAB	-	BGB 281	Akondro Mainty	AA	-
BGB 167	Prata Pacovan	AAB	Prata/pome	BGB 057	Mangana	AA	-
BGB 112	Adimoo	AAB	-	BGB 292	Paliama	AA	-
BGB 142	Nº 113	AAB	-	BGB 060	Jambi	AA	-
BGB 110	Saney	AAB	-	BGB 072	Khae	AA	-
BGB 123	Umpako	AAB	-	BGB 280	Sa	AA	-
BGB 129	Pisang Ceylan	AAB	-	BGB 069	Pisang Kermain	AA	-
BGB 121	Yangambi Nº2	AAB	Maçã/Silk	BGB 075	Khae Prae	AA	-
-	Prata Gorutuba	AAB	-	BGB 296	Pisang Lilin	AA	-
BGB 310	Pisang Palembang	AAB	-	BGB 294	Pisang Jari Buaya	AA	-
BGB 217	Padath	AAB	-	BGB 082	Lateina BT-100	AA	-
BGB 313	Figue Pomme Géante	AAB	-	DM	042023-03	AA	-
BGB 199	Giral	AAB	-	DM	091087-02	AA	-
BGB 213	Prata Comum	AAB	Prata/pome	DM	SH3362	AA	-
BGB 218	Prata Manteiga	AAB	Prata/pome	DM	003004-02	AA	-
BGB 188	Prata Anã 1	AAB	Prata/pome	DM	013019-01	AA	-
BGB 179	Prata Anã 2	AAB	Prata/pome	DM	041054-04	AA	-
BGB 210	Pratão	AAB	Prata/pome	DM	050012-02	AA	-
BGB 224	Enxerto 33	AAB	-	DM	086094-15	AA	-
BGB 208	Prata Branco	AAB	Prata/pome	DM	042015-02	AA	-
BGB 209	Prata Ponta Aparada	AAB	Prata/pome	DM	SH3263	AA	-
BGB 206	Prata Anã	AAB	Prata/pome	DM	042085-02	AA	-
BGB 311	Pisang Rajah	AAB	-	DM	042079-06	AA	-
BGB 185	Prata São Tomé	AAB	-	DM	017041-01	AA	-

**Tabela Suplementar 1.** Acessos do banco de germoplasma da Embrapa utilizados na identificação de espécies virais de BSV por meio de primers espécie-específicos. Embrapa 2019. Continuação.....

BGB 314	Uzakan	AAB	-	DM	042052-03	AA	-
BGB 203	Pacovan	AAB	Cultivar/ Prata(pome)	DM	042049-04	AA	-
BGB 317	Blue Java	AAB	-	DM	013004-04	AA	-
BGB 207	Java IAC	AAB	-	DM	003023-03	AA	-
BGB 205	Walha	AAB	Prata/pome	DM	086094-20	AA	-
BGB 131	Tugoomomboo	AAB	-	DM	001016-01	AA	-
BGB 316	Simili Radjah	AAB	-	DM	091094-04	AA	-
BGB 138	Thap Maeo	AAB	Cultivar	DM	TH-0301	AA	-
BGB 322	Maçã	AAB	-	DM	041054-08	AA	-
BGB 148	Kaiapó	AAB	-	DM	058054-03	AA	-
BGB 165	Prata Zulu	ABB	-	DM	089087-01	AA	-
BGB 245	Poteau Naine	ABB	Bluggoe	DM	003037-02	AA	-
BGB 176	Benedetta	ABB	Saba	DM	086079-09	AA	-
BGB 244	Abuperak	ABB	-	DM	073041-01	AA	-
BGB 191	Cachaco	ABB	Bluggoe	DM	013018-01	AA	-
BGB 215	Saba	ABB	Saba	DM	028003-01	AA	-
BGB 194	Pelipita	ABB	Pelipita	DM	091079-03	AA	-
BGB 200	Pitogo	ABB	-	BGB 153	Robusta IAC	AAA	-
BGB 247	Figo	ABB	-	BGB 114	Wasolay	AAA	-
BGB 214	Saba Honduras	ABB	Saba	BGB 093	Bakar	AAA	-
BGB175	IceCream	ABB	-	BGB 156	Robusta	AAA	-
BGB 181	Champa Madras	ABB	Bluggoe	BGB 152	Nanicão Taperão	AAA	-
BGB 190	Tai	ABB	-	BGB 108	São Tomé	AAA	-
BGB 216	Espermo	ABB	Bluggoe	BGB 107	Torp	AAA	-
BGB 174	NamwaDaeng	ABB	-	BGB 106	Ouro Mel	AAA	-
BGB 145	Figo Cinza	ABB	Pisanawak	BGB 111	Pisang Sri (SRI)	AAA	-
BGB 119	NamwaKhom	ABB	-	BGB 105	Pagatow	AAA	-
BGB 136	Pacha	ABB	-	BGB 102	Orotawa	AAA	-
BGB 125	Muisa Tia	ABB	Pisanawak	BGB 097	Walebo	AAA	-
BGB 172	Monthan	ABB	-	BGB 157	Canela IAC	AAA	-

**Tabela Suplementar 1.** Acessos do banco de germoplasma da Embrapa utilizados na identificação de espécies virais de BSVpor meio de primers espécie-específicos. Embrapa 2019. Continuação.....

BGB 147	Cacambou Naine	ABB	Bluggoe	BGB 127	Yangambi Km 5	AAA	-
BGB 229	Pioneira	AAAB	-	BGB 099	Muga	AAA	-
BGB 231	Garantida	AAAB	Cultivar/ prata são tomé x m53	BGB 101	Markatooa	AAA	<i>Cultivar/Ibota</i>
BGB 198	Pacovan Ken	AAAB	Cultivar/ pacovan x m53	BGB 117	Pisang Umbuk	AAA	-
BGB 226	BRS Japira	AAAB	Cultivar	BGB 079	Pirua	AAA	-
BGB 243	BRS Princesa	AAAB	Cultivar	BGB 144	Morong	AAA	-
BGB 221	BRS Platina	AAAB	Cultivar	BGB 150	Nanção Franco Rio Claro	AAA	-
BGB 240	BRS Vitoria	AAAB	Cultivar	BGB 155	Grande Naine IAC	AAA	-
BGB 238	BRS Preciosa	AAAB	Cultivar	BGB 154	Imperial IAC	AAA	-
BGB 235	Maravilha	AAAB	Cultivar/ prata anãx SH3142	BGB 158	Lacatan 47	AAA	-
BGB 321	BRS Caprichosa	AAAB	Cultivar	BGB 094	Caru Roxo	AAA	-
BGB 211	BRS Pacoua	AAAB	Cultivar/ pacovan x calcutta 4	BGB 104	BRS SCS Belluna	AAA	<i>Cavendish</i>
BGB 277	BRS Tropical	AAAB	cultivar yangambi n.2 x m53	BGB 085	Williams	AAA	<i>Red</i>
BGB323	FHIA 21	AAAB	híbrido de plátano	BGB 098	Cocos	AAA	<i>Cultivar</i>
BGB 234	PV 42-129	AAAB	-	BGB 096	Maída	AAA	-
BGB 242	Galeo 18	AAAB	-	BGB 013	Tambi	AAA	<i>Gros Michel</i>
BGB 227	YB 42-17	AAAB	-	BGB 083	Imperial	AAA	-
BGB 236	JV 42-44	AAAB	-	BGB 080	Nanica	AAA	-
BGB 212	PV 42-114	AAAB	Híbrido/ pacovan x m53	BGB 081	Valery	AAA	-
BGB 223	YB 42-47	AAAB	-	BGB 095	Leite	AAA	<i>Cavendish</i>
BGB 197	Azedinha	AAAB	-	BGB 040	Pisang Pipit	AAA	<i>Cavendish</i>
BGB 187	FHIA 18	AAAB	Prata Anãx SH3142	BGB 103	Roombum	AAA	-
BGB 220	JV 42-35	AAAB	-	BGB 090	Caru Verde	AAA	-
BGB 163	Porp	AAAB	-	BGB 115	Toowoolee	AAA	-
BGB 222	PV 42-53	AAAB	-	BGB 084	Canela	AAA	<i>Red</i>
BGB 369	PA 42-28	AAAB	-	BGB 087	Poyo	AAA	-
BGB 230	YB 42-08	AAAB	-	BGB 088	Lacatan	AAA	-
BGB 239	PV 94-01	AAAB	-	BGB 092	Dodoga	AAA	<i>Cavendish</i>
BGB 278	YB 42-03	AAAB	-	BGB 089	Amritsagar	AAA	-
BGB 368	PA 42-38	AAAB	-	BGB 196	Grande Naine P.Formoso	AAA	-

**Tabela Suplementar 1.** Acessos do banco de germoplasma da Embrapa utilizados na identificação de espécies virais de BSVpor meio de primers espécie-específicos. Embrapa 2019. Continuação.....

BGB 370	PA 42-19	AAAB	-	BGB 193	Meywarvey	AAA	-
BGB 132	Langka	AAAB	-	BGB 160	Kongo	AAA	-
BGB 120	Platina IAC	AAAB	-	BGB 271	Nanicão Jangada	AAA	-
BGB 118	Ouro da Mata	AAAB	Prata/pome	BGB 186	Highgate	AAA	-
BGB 161	Ouro da Mata Franco	AAAB	-	BGB 195	Who-Gru	AAA	-
BGB 219	FHIA 02	AAAB	híbrido williamsxSH3393	BGB 306	Gros-Michel	AAA	-
BGB 241	ST12-31	AAAB	-	BGB 265	Mutante de Grande Naine	AAA	-
BGB 275	ITC 504	AAAB	-	BGB 268	Nanicão Cena 224	AAA	-
BGB 274	ITC 505	AAAB	-	BGB 270	Nanicão de Indio	AAA	<i>Cavendish</i>
-	TM 2803	AAAB	-	BGB 183	Khai Tong Ruang	AAA	<i>Cavendish</i>
-	PC0101	AAAB	-	BGB 285	Mossi	AAA	<i>Cavendish</i>
BGB 192	Prata Maça	AAAB	-	BGB 304	Petite Naine	AAA	-
BGB 149	FC06-02	AABB	-	BGB 303	Red Dacca	AAA	-
BGB 228	FHIA 03	AABB	-	BGB 276	Nanicão Viana	AAA	-
BGB 180	Teparod	ABBB	-	BGB 308	Mbwazirume	AAA	-
BGB 298	SafetVelchi 9	AB	-	BGB 272	IAC 2001	AAA	-
BGB 066	IAC 1	AB	-	BGB 302	Leite	AAA	-
BGB 067	Uwati	AA	-	BGB 305	Khai Thong Ruang	AAA	-
BGB 052	F3 P4	AA	-	BGB 225	Bucaneiro	AAAA	-
BGB 053	PA Phatthalung	AA	-	BGB 273	FHIA 17	AAAA	-
BGB 062	Pisang Serum	AA	ssp. Malaccensis	BGB 279	FHIA 23	AAAA	<i>High Gate x 2n</i>
BGB 045	KrasanSaichon	AA	-	BGB 233	Ambrosia	AAAA	-
BGB 064	IDO 110	AA	-	BGB 237	Calypso	AAAA	-
BGB 044	Tuugia	AA	-	BGB 124	IC 2	AAAA	<i>High Gate x 2n</i>
BGB 038	Pisang Tongat	AA	ssp. Erans	BGB 264	Musa Coccinea	ES	<i>High Gate x 2n</i>
BGB 028	Khai	AA	-	BGB 263	Musa Ornata	ES	<i>High Gate x 2n</i>
BGB 015	Pisang Madu	AA	-	BGB 001	M.Ornata x M. Velutina	ES	-
BGB 019	Birmanie	AA	-	BGB 003	Musa Laterita	ES	-
BGB 049	Tong Dok Mak	AA	-	BGB 266	Bronze	ES	<i>Rodochlamys</i>
							-



**Tabela Suplementar 1.** Acessos do banco de germoplasma da Embrapa utilizados na identificação de espécies virais de BSV por meio de primers espécie-específicos. Embrapa 2019. Continuação.....

BGB 133	Pulut	AAB	-	BGB 041	SF-751	AA	<i>ssp. Malaccensis</i>
BGB 159	Prata Anã Branca	AAB	Prata/pome	BGB 026	Khai Nai On	AA	-
BGB 166	Prata Anã Batico	AAB	Prata/pome	BGB 030	Khi Maeo	AA	-
BGB 141	Tip Khan	AAB	-	BGB 022	NBA-14	AA	-
BGB 137	Moenang	AAB	-	BGB 029	Pisang Berlin	AA	<i>ssp. Banksii</i>
BGB 171	Prata Jussara IAC	AAB	Prata/pome	BGB 024	Baby Yadefana	AA	-
BGB 173	Pisang KepokBung	AAB	-	BGB 281	Akondro Mainty	AA	-
BGB 167	Prata Pacovan	AAB	Prata/pome	BGB 057	Mangana	AA	-
BGB 112	Adimoo	AAB	-	BGB 292	Paliama	AA	-
BGB 142	Nº 113	AAB	-	BGB 060	Jambi	AA	-
BGB 110	Saney	AAB	-	BGB 072	Khae	AA	-
BGB 123	Umpako	AAB	-	BGB 280	Sa	AA	-
BGB 129	Pisang Ceylan	AAB	-	BGB 069	Pisang Kermain	AA	-
BGB 121	Yangambi Nº2	AAB	Maçã/Silk	BGB 075	Khae Prae	AA	-
-	Prata Gorutuba	AAB	-	BGB 296	Pisang Lilin	AA	-
BGB 310	Pisang Palembang	AAB	-	BGB 294	Pisang Jari Buaya	AA	-
BGB 217	Padath	AAB	-	BGB 082	Lateína BT-100	AA	-
BGB 313	Figue Pomme Géante	AAB	-	DM	042023-03	AA	-
BGB 199	Giral	AAB	-	DM	091087-02	AA	-
BGB 213	Prata Comum	AAB	Prata/pome	DM	SH3362	AA	-
BGB 218	Prata Manteiga	AAB	Prata/pome	DM	003004-02	AA	-
BGB 188	Prata Anã 1	AAB	Prata/pome	DM	013019-01	AA	-
BGB 179	Prata Anã 2	AAB	Prata/pome	DM	041054-04	AA	-
BGB 210	Pratão	AAB	Prata/pome	DM	050012-02	AA	-
BGB 224	Enxerto 33	AAB	-	DM	086094-15	AA	-
BGB 208	Prata Branco	AAB	Prata/pome	DM	042015-02	AA	-
BGB 209	Prata Ponta Aparada	AAB	Prata/pome	DM	SH3263	AA	-
BGB 206	Prata Anã	AAB	Prata/pome	DM	042085-02	AA	-
BGB 311	Pisang Rajah	AAB	-	DM	042079-06	AA	-
BGB 185	Prata São Tomé	AAB	-	DM	017041-01	AA	-
BGB 314	Uzakan	AAB	-	DM	042052-03	AA	-
BGB 203	Pacovan	AAB	Cultivar/ Prata(pome)	DM	042049-04	AA	-

**Tabela Suplementar 1.** Acessos do banco de germoplasma da Embrapa utilizados na identificação de espécies virais de BSV por meio de primers espécie-específicos. Embrapa 2019. Continuação.....

BGB 317	Blue Java	AAB	-	DM	013004-04	AA	-
BGB 207	Java IAC	AAB	-	DM	003023-03	AA	-
BGB 205	Walha	AAB	Prata/pome	DM	086094-20	AA	-
BGB 131	Tugoomomboo	AAB	-	DM	001016-01	AA	-
BGB 316	Simili Radjah	AAB	-	DM	091094-04	AA	-
BGB 138	Thap Maeo	AAB	Cultivar	DM	TH-0301	AA	-
BGB 322	Maçã	AAB	-	DM	041054-08	AA	-
BGB 148	Kaiapó	AAB	-	DM	058054-03	AA	-
BGB 165	Prata Zulu	ABB	-	DM	089087-01	AA	-
BGB 245	Poteau Naine	ABB	Bluggoe	DM	003037-02	AA	-
BGB 176	Benedetta	ABB	Saba	DM	086079-09	AA	-
BGB 244	Abuperak	ABB	-	DM	073041-01	AA	-
BGB 191	Cachaco	ABB	Bluggoe	DM	013018-01	AA	-
BGB 215	Saba	ABB	Saba	DM	028003-01	AA	-
BGB 194	Pelipita	ABB	Pelipita	DM	091079-03	AA	-
BGB 200	Pitogo	ABB	-	BGB 153	Robusta IAC	AAA	-
BGB 247	Figo	ABB	-	BGB 114	Wasolay	AAA	-
BGB 214	Saba Honduras	ABB	Saba	BGB 093	Bakar	AAA	-
BGB175	IceCream	ABB	-	BGB 156	Robusta	AAA	-
BGB 181	Champa Madras	ABB	Bluggoe	BGB 152	Nanicão Taperão	AAA	-
BGB 190	Tai	ABB	-	BGB 108	São Tomé	AAA	-
BGB 216	Espermo	ABB	Bluggoe	BGB 107	Torp	AAA	-
BGB 174	NamwaDaeng	ABB	-	BGB 106	Ouro Mel	AAA	-
BGB 145	Figo Cinza	ABB	Pisanawak	BGB 111	Pisang Sri (SRI)	AAA	-
BGB 119	NamwaKhom	ABB	-	BGB 105	Pagatow	AAA	-
BGB 136	Pacha	ABB	-	BGB 102	Orotawa	AAA	-
BGB 125	Muisa Tia	ABB	Pisanawak	BGB 097	Walebo	AAA	-
BGB 172	Monthan	ABB	-	BGB 157	Canela IAC	AAA	-
BGB 147	Cacambou Naine	ABB	Bluggoe	BGB 127	Yangambi Km 5	AAA	-
BGB 229	Pioneira	AAAB	-	BGB 099	Muga	AAA	-

**Tabela Suplementar 1.** Acessos do banco de germoplasma da Embrapa utilizados na identificação de espécies virais de BSVpor meio de primers espécie-específicos. Embrapa 2019. Continuação.....

BGB 231	Garantida	AAAB	Cultivar/ prata são tomé x m53	BGB 101	Markatooa	AAA	Cultivar/lbota
BGB 198	Pacovan Ken	AAAB	Cultivar/ pacovan x m53	BGB 117	Pisang Umbuk	AAA	-
BGB 226	BRS Japira	AAAB	Cultivar	BGB 079	Pirua	AAA	-
BGB 243	BRS Princesa	AAAB	Cultivar	BGB 144	Morong	AAA	-
BGB 221	BRS Platina	AAAB	Cultivar	BGB 150	Nanção Franco Rio Claro	AAA	-
BGB 240	BRS Vitoria	AAAB	Cultivar	BGB 155	Grande Naine IAC	AAA	-
BGB 238	BRS Preciosa	AAAB	Cultivar	BGB 154	Imperial IAC	AAA	-
BGB 235	Maravilha	AAAB	Cultivar/ prata anãx SH3142	BGB 158	Lacatan 47	AAA	-
BGB 321	BRS Caprichosa	AAAB	Cultivar	BGB 094	Caru Roxo	AAA	-
BGB 211	BRS Pacoua	AAAB	Cultivar/ pacovan x calcutta 4	BGB 104	BRS SCS Belluna	AAA	Cavendish
BGB 277	BRS Tropical	AAAB	cultivar yangambi n.2 x m53	BGB 085	Williams	AAA	Red
BGB323	FHIA 21	AAAB	híbrido de plátano	BGB 098	Cocos	AAA	Cultivar
BGB 234	PV 42-129	AAAB	-	BGB 096	Maída	AAA	-
BGB 242	Galeo 18	AAAB	-	BGB 013	Tambi	AAA	Gros Michel
BGB 227	YB 42-17	AAAB	-	BGB 083	Imperial	AAA	-
BGB 236	JV 42-44	AAAB	-	BGB 080	Nanica	AAA	-
BGB 212	PV 42-114	AAAB	Híbrido/ pacovan x m53	BGB 081	Valery	AAA	-
BGB 223	YB 42-47	AAAB	-	BGB 095	Leite	AAA	Cavendish
BGB 197	Azedinha	AAAB	-	BGB 040	Pisang Pipit	AAA	Cavendish
BGB 187	FHIA 18	AAAB	Prata Anãx SH3142	BGB 103	Roombum	AAA	-
BGB 220	JV 42-35	AAAB	-	BGB 090	Caru Verde	AAA	-
BGB 163	Porp	AAAB	-	BGB 115	Toowoolee	AAA	-
BGB 222	PV 42-53	AAAB	-	BGB 084	Canela	AAA	Red
BGB 369	PA 42-28	AAAB	-	BGB 087	Poyo	AAA	-
BGB 230	YB 42-08	AAAB	-	BGB 088	Lacatan	AAA	-
BGB 239	PV 94-01	AAAB	-	BGB 092	Dodoga	AAA	Cavendish
BGB 278	YB 42-03	AAAB	-	BGB 089	Amritsagar	AAA	-
BGB 368	PA 42-38	AAAB	-	BGB 196	Grande Naine P.Formoso	AAA	-
BGB 370	PA 42-19	AAAB	-	BGB 193	Meywarvey	AAA	-
BGB 132	Langka	AAAB	-	BGB 160	Kongo	AAA	-

**Tabela Suplementar 1.** Acessos do banco de germoplasma da Embrapa utilizados na identificação de espécies virais de BSVpor meio de primers espécie-específicos. Embrapa 2019. Continuação.....

BGB 120	Platina IAC	AAAB	-	BGB 271	Nanicão Jangada	AAA	-
BGB 118	Ouro da Mata	AAAB	Prata/pome	BGB 186	Highgate	AAA	-
BGB 161	Ouro da Mata Franco	AAAB	-	BGB 195	Who-Gru	AAA	-
BGB 219	FHIA 02	AAAB	híbrido williamsxSH3393	BGB 306	Gros-Michel	AAA	-
BGB 241	ST12-31	AAAB	-	BGB 265	Mutante de Grande Naine	AAA	-
BGB 275	ITC 504	AAAB	-	BGB 268	Nanicão Cena 224	AAA	-
BGB 274	ITC 505	AAAB	-	BGB 270	Nanicão de Indio	AAA	Cavendish
-	TM 2803	AAAB	-	BGB 183	Khai Tong Ruong	AAA	Cavendish
-	PC0101	AAAB	-	BGB 285	Mossi	AAA	Cavendish
BGB 192	Prata Maça	AAAB	-	BGB 304	Petite Naine	AAA	-
BGB 149	FC06-02	AABB	-	BGB 303	Red Dacca	AAA	-
BGB 228	FHIA 03	AABB	-	BGB 276	Nanicão Viana	AAA	-
BGB 180	Teparod	ABBB	-	BGB 308	Mbwazirume	AAA	-
BGB 298	SafetVelchi 9	AB	-	BGB 272	IAC 2001	AAA	-
BGB 066	IAC 1	AB	-	BGB 302	Leite	AAA	-
BGB 067	Uwati	AA	-	BGB 305	Khai Thong Ruang	AAA	-
BGB 052	F3 P4	AA	-	BGB 225	Bucaneiro	AAAA	-
BGB 053	PA Phatthalung	AA	-	BGB 273	FHIA 17	AAAA	-
BGB 062	Pisang Serum	AA	<i>ssp. Malaccensis</i>	BGB 279	FHIA 23	AAAA	High Gate x 2n
BGB 045	KrasanSaichon	AA	-	BGB 233	Ambrosia	AAAA	-
BGB 064	IDO 110	AA	-	BGB 237	Calypso	AAAA	-
BGB 044	Tuugia	AA	-	BGB 124	IC 2	AAAA	High Gate x 2n
BGB 038	Pisang Tongat	AA	<i>ssp. Erans</i>	BGB 264	Musa Coccinea	ES	High Gate x 2n
BGB 028	Khai	AA	-	BGB 263	Musa Ornata	ES	High Gate x 2n
BGB 015	Pisang Madu	AA	-	BGB 001	<i>M. Ornata x M. Velutina</i>	ES	-
BGB 019	Birmanie	AA	-	BGB 003	<i>Musa Laterita</i>	ES	-
BGB 049	Tong Dok Mak	AA	-	BGB 266	Bronze	ES	<i>Rodochlamys</i>
							-

**Tabela Suplementar 2 - Primers utilizados para amplificação de fragmentos genômicos do Vírus das Estrias da Bananeira(BSV) pela técnica de PCR.**

Alvo	Tipo de Marcadores	Nome do Primer	Sequência do Primer(5'-3')	Tamanho do produto de PCR(pb)	Tm (°C)	
eBSGFV	Integração (Junção)	VM1F	TTGTCCAAAATCTGCTCGTG	481	60	
		VM1R	TGTAATTCCTGCTCCTGCAA			
		VM2F	TTCTCCCTTTTCGATCCGTA			
		VM2R	TTTTGATGCATCTCCAGCAG			
	Estrutural (Interno)	VV1F	ACAGCTCCAGGAGATTGGAA	268	60	
		VV1R	CTGAAGTGTGCCTGTGGAGA			
		VV2F	TCTGAGATCTCCAGCCAGGT			
		VV2R	GACAGTTCCGCACAGCAGA			
		VV3F	TTGCCAAGAATTCCTCCAAG	639	60	
		VV3R	AAGTTCTTGTGCGCAAGGTG			
		VV4F	GAGCAACACGAGTCAACGAA			
		VV4R	TCTCCACAGGCACACTTCAG			
		VV6F	GCATGAAGCATGACTGGAGA	784	60	
		VV6R	AATGCATAAGGGCCTCGAAT			
		VV5F	CCATGGAGTTGACCTGTCT			
		VV5R	ACCCCTCTGTCTTCCCACT			
	Alélico	DifGfF	TTGCAGGAGCAGGAATTACA	628	60	
		DifGfR	GGATGGAAGATGAGCTCTTTG			
	eBSOLV	Integração (Junção)	Musa-O1F	TGCATTAGATGGTCTGGGAAA	563	60
			Musa-O1R	ACTTCACGATGCCCCATGTTT		
Musa-O2F			GAGCTGTTTCCTCCGTGTCT			
Musa-O2R			CCTGGAAGAAAGCAGACGAG			
Estrutural (Interno)		sig1 eBSOLVF	TTCGAGGAGTCAACGGAGTC	606	60	
		sig1 eBSOLVR	CCTGGTCTGCACAGAGATGA			
		sig2 eBSOLVF	CTTGCTCTGTGGCAAGACT			
		sig2 eBSOLVR	CCATTTTTCTCGCAGATTGTC			
Alélico		Marker1-BSOLV(2) F	ATACGAAGCCCAACGAATTG	601	65	
		Marker1-BSOLV(2) R	ATGGCTTGCC TTCACAGATT			
		Marker2-BSOLV(2) F	ACTCGCACAAAGTGA ACTCG	399	60	
		Marker2-BSOLV(2) R	ACAGTACAAGCCCCACCAAT			
		Marker2-BSOLV(1) F	GTGGTGGTTCTTGATCCGGT	1469	65	
		Marker2-BSOLV(1) R	CACGTGGTAGGGGTCCGCCA			
		Dif-OL(F) (HaeIII)	GAATCATTATTCGAGGAGTCAACGG			
		Dif-OL(R) (HaeIII)	CGAGTAGAGCGCAAGATCCTAGTTC			
		Dif-OL(F) (AhdI)	TTGGAACAAGACAGATTGACTTCT	500	65	
		Dif-OL(R) (AhdI)	GGTTCGTTTTTATGGCTTTCATGG			
		Integração (Junção)	Musa/F2-F	ACTCAGCAAAGGCAAGCAGT	561	60
			Musa/F2-R	TCTGGTGTGAGTTTTAATAATACCG		

**Tabela Suplementar 2** - Primers utilizados para amplificação de fragmentos genômicos do Vírus das Estrias da Bananeira(BSV) pela técnica de PCR. Continuação....

<b>eBSOLV</b>	Integração (Junção)	F5/Musa-F	GTATGGTTCTTGCCCGATGA		
		F5/Musa-R	TCGTGCAGACCCCTTACTCT	594	60
<b>eBSIMV</b>	Estrutural (Interno)	F1/F3-F	TTCGGTATTATTA AAACTCACACCA		
		F1/F3-R	GCTGCTAACTGAGGATAATCGAA	490	60
		F3/F4-F	TCCCACGCAAGCTTACTTCT		
		F3/F4-R	GAAGCTGTCCAAGCCTATATCA	600	60
		F4/F5-F	TGGACAGCTTCTGGTGTGAG		
		F4/F5-R	AGCCAGCTACAACCCTGGAGA	540	60

**(Chabanes et al., 2013)**

**Tabela Suplementar 3.** Indexação por IC-PCR dos 138 acessos positivos para a presença do BSV endógeno das espécies BSOLV, BSGFV e BSIMV. Embrapa, 2019.

<b>Code</b>	<b>Genotypes</b>	<b>Ploidy</b>	<b>OL</b>	<b>GF</b>	<b>IM</b>
BGB 219	FHIA 02	AAAB	-	-	-
BGB 241	ST12-31	AAAB	+	-	-
BGB 323	FHIA 21	AAAB	-	-	-
BGB 229	BRS Pioneira	AAAB	-	-	-
BGB 234	PV 42-129	AAAB	-	-	-
BGB 198	BRS Pacovan Ken	AAAB	-	+	-
BGB 221	BRS Platina	AAAB	-	+	-
BGB 227	YB 42-17	AAAB	-	-	-
BGB 236	JV 42-44	AAAB	-	-	-
BGB 212	PV 42-114	AAAB	-	-	-
BGB 231	BRS Garantida	AAAB	-	-	-
BGB 223	YB 42-47	AAAB	+	-	-
BGB 197	Azedinha	AAAB	-	+	-
BGB 187	FHIA 18	AAAB	-	-	-
BGB 220	JV 42-35	AAAB	-	-	-
BGB 163	Porp	AAAB	-	-	-
BGB 222	PV 42-53	AAAB	-	-	-
BGB 226	BRS Japira	AAAB	-	-	-
BGB 369	PA 42-28	AAAB	-	-	-
BGB 230	YB 42-08	AAAB	+	-	-
BGB 240	BRS Vitoria	AAAB	-	-	-
BGB 239	PV 94-01	AAAB	-	-	-
BGB 278	YB 42-03	AAAB	-	-	-
BGB 368	PA 42-38	AAAB	-	-	-
BGB 370	PA 42-19	AAAB	-	-	-
BGB 243	BRS Princesa	AAAB	-	-	-
BGB 132	Pisang Langka	AAAB	+	-	-
BGB 120	Platina IAC	AAAB	+	-	-
BGB 118	Ouro da Mata	AAAB	-	-	-
BGB 161	Ouro da Mata Franco	AAAB	-	-	-
BGB 242	Galeo 18	AAAB	-	-	-
BGB 238	BRS Preciosa	AAAB	-	-	-
BGB 235	FHIA 01	AAAB	-	-	-
BGB 275	ITC 504	AAAB	-	-	-
BGB 274	ITC 505	AAAB	+	-	-
BGB 277	BRS Tropical	AAAB	-	-	-
-	TM 2803	AAAB	-	-	-
-	PC 0101	AAAB	-	-	-
BGB 192	Prata Maçã	AAAB	+	-	-

**Tabela Suplementar 3.** Indexação por IC-PCR dos 138 acessos positivos para a presença do BSV endógeno das espécies BSOLV, BSGFV e BSIMV. Embrapa, 2019.Continuação...

BGB 321	Caprichosa	AAAB	-	-	-
BGB 211	BRS Pacoua	AAAB	-	-	-
BGB 248	Curare Enano	AAB	-	-	-
BGB 254	Terra Sem Nome	AAB	-	-	-
BGB 250	Red Yad	AAB	-	-	-
BGB 257	Tipo Velhaca	AAB	-	-	-
BGB 255	Terra Ponta Aparada	AAB	-	-	-
BGB 256	Pinha	AAB	-	-	-
BGB 258	Chifre de Vaca	AAB	-	-	-
BGB 253	Mongolô	AAB	-	-	-
BGB 260	Terra Maranhão	AAB	+	-	-
BGB 252	D' Angola	AAB	-	-	-
BGB 261	Trois Vert	AAB	-	-	-
BGB 259	Comprida	AAB	-	-	-
BGB 251	Terra Anã Branca	AAB	NT	NT	NT
BGB 246	Terrinha	AAB	+	-	-
BGB 249	Samura B	AAB	+	-	-
BGB 135	Mysore	AAB	+	-	-
BGB 162	Macaubal "A"	AAB	-	-	-
BGB 170	Prata Anã Taperão	AAB	-	-	-
BGB 178	Prata Anã 3	AAB	-	-	-
BGB 177	Prata Maceió	AAB	-	-	-
BGB 143	Poovan	AAB	-	-	-
BGB 168	Prata Anã Rene	AAB	-	-	-
BGB 146	Pisang Kelat	AAB	-	-	-
BGB 133	Pulut	AAB	+	-	-
BGB 159	Prata Anã Branca	AAB	-	-	-
BGB 166	Prata Anã Batico	AAB	-	-	-
BGB 141	Tip Khan	AAB	-	-	-
BGB 137	Moenang	AAB	-	-	-
BGB 171	Prata Jussara IAC	AAB	-	-	-
BGB 173	Pisang KepokBung	AAB	-	-	-
BGB 167	Prata Pacovan	AAB	+	-	-
BGB 112	Adimoo	AAB	-	-	-
BGB 142	Nº 113	AAB	-	-	-
BGB 110	Saney	AAB	-	-	-
BGB 123	Umpako	AAB	-	-	-
BGB 129	Pisang Ceylan	AAB	-	-	-



**Tabela Suplementar 3.** Indexação por IC-PCR dos 138 acessos positivos para a presença do BSV endógeno das espécies BSOLV, BSGFV e BSIMV. Embrapa, 2019. Continuação...

BGB 121	Yangambi N°2	AAB	-	-	-
-	Prata Gorutuba	AAB	-	+	-
BGB 310	Pisang Palembang	AAB	-	-	-
BGB 217	Padath	AAB	-	-	-
BGB 199	Giral	AAB	-	-	-
BGB 213	Prata Comum	AAB	-	-	-
BGB 218	Prata Manteiga	AAB	-	-	-
BGB 188	Prata Anã 1	AAB	-	-	-
BGB 179	Prata Anã 2	AAB	-	-	-
BGB 210	Pratão	AAB	-	-	-
BGB 224	Enxerto 33	AAB	-	+	-
BGB 208	Prata Branco	AAB	-	-	-
BGB 209	Prata Ponta Aparada	AAB	-	-	-
BGB 206	Prata Anã	AAB	-	-	-
BGB 185	Prata São Tomé	AAB	-	-	-
BGB 203	Pacovan	AAB	-	-	-
BGB 317	Blue Java	AAB	-	-	-
BGB 207	Java IAC	AAB	-	-	-
BGB 205	Walha	AAB	-	-	-
BGB 316	Simili Radjah	AAB	-	+	-
BGB 138	Thap Maeo	AAB	-	-	-
BGB 148	Kaiapó	AAB	-	-	-
BGB 313	Figue Pomme Géante	AAB	-	-	-
BGB 311	Pisang Rajah	AAB	-	-	-
BGB 314	Uzakan	AAB	-	-	-
BGB 131	Tugoomomboo	AAB	+	-	-
BGB 322	Maçã	AAB	-	-	-
BGB 149	FC06-02	AABB	-	-	-
BGB 228	FHIA 03	AABB	-	-	-
BGB 298	SafetVelchi 9	AB	-	-	-
BGB 066	IAC 1	AB	-	-	-
BGB 165	Prata Zulu	ABB	-	-	-
BGB 194	Pelipita	ABB	-	-	-
BGB 200	Pitogo	ABB	-	-	-
BGB 247	Figo	ABB	-	-	-
BGB 214	Saba Honduras	ABB	-	-	-
BGB 175	Ice Cream	ABB	-	-	-
BGB 181	Champa Madras	ABB	-	-	-

**Tabela Suplementar 3.** Indexação por IC-PCR dos 138 acessos positivos para a presença do BSV endógeno das espécies BSOLV, BSGFV e BSIMV. Embrapa, 2019. Continuação...

	Tai	ABB	-	-	-
BGB 190					
BGB 216	Espermo	ABB	-	-	-
BGB 174	NamwaDaeng	ABB	-	-	-
BGB 145	Figo Cinza	ABB	-	-	-
BGB 119	NamwaKhom	ABB	-	-	-
BGB 136	Pacha	ABB	-	-	-
BGB 125	Muísa Tia	ABB	-	-	-
BGB 172	Monthan	ABB	-	-	-
BGB 147	Cacambou Naine	ABB	-	-	-
BGB 245	Poteau Naine	ABB	-	-	-
BGB 176	Benedetta	ABB	-	-	-
BGB 244	Abuperak	ABB	-	-	-
BGB 191	Cachaco	ABB	-	-	-
BGB 215	Saba	ABB	-	-	-
BGB 180	Teparod	ABBB	-	-	-
BGB 058	BB França	BB	-	-	-
BGB 059	Butuhan	BB	-	-	-
BGB 061	Diploide da Belgica	BB	-	-	-
BGB 074	Balbisiana Franca	BB	-	-	-
BGB 056	BB IAC	BB	-	-	-
BGB 301	Monthan	BB	-	-	-
BGB 076	Musa balbisiana	BB	-	-	-
BGB 073	BB Panamá	BB	-	-	-