

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS

**DIVERSIDADE GENÉTICA DE ESPÉCIES DO VÍRUS DAS ESTRIAS DA
BANANEIRA (eBSV) EM ACESSOS DA COLEÇÃO DE GERMOPLASMA DA
EMBRAPA MANDIOCA E FRUTICULTURA**

DALMA BRITO SANTOS

Bacharel em Biologia

CRUZ DAS ALMAS
BAHIA-BRASIL
2017

DALMA BRITO SANTOS

**DIVERSIDADE GENÉTICA DE ESPÉCIES DO VÍRUS DAS ESTRIAS DA
BANANEIRA (eBSV) EM ACESSOS DA COLEÇÃO DE GERMOPLASMA DA
EMBRAPA MANDIOCA E FRUTICULTURA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia,
como parte das exigências do Curso de
Graduação de Bacharelado em Biologia, para
obtenção do título de Bacharel em Biologia.

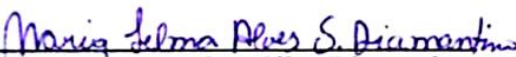
CRUZ DAS ALMAS
BAHIA - BRASIL
2017

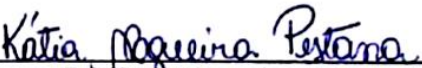
DALMA BRITO SANTOS

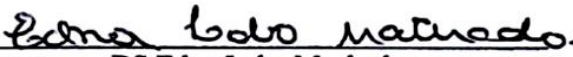
**DIVERSIDADE GENÉTICA DE ESPÉCIES DO VÍRUS DAS ESTRIAS DA
BANANEIRA (eBSV) EM ACESSOS DA COLEÇÃO DE GERMOPLASMA DA
EMBRAPA MANDIOCA E FRUTICULTURA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia,
como parte das exigências do Curso de
Graduação de Bacharelado em Biologia, para
obtenção do título de Bacharel em Biologia.

APROVADO: 07 de fevereiro de 2017


DS Maria Selma Alves Silva Diamantino
Embrapa Mandioca e Fruticultura


DS Kátia Nogueira Pestana
Faculdade Maria Milza (FAMAM)


DS Edna Lobo Machado
Orientadora
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia

*A todos aqueles que direta ou
indiretamente contribuíram para a
conclusão deste sonho.*

Dedico

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Universidade Federal do Recôncavo da Bahia pela oportunidade de acesso ao ensino superior.

À Embrapa Mandioca e Fruticultura por ter me concedido a oportunidade de executar este trabalho, além de fornecer condições técnicas e logísticas para seu desenvolvimento.

Agradeço ao CIRAD - Centro de Cooperação Internacional em Pesquisa Agrônômica para o Desenvolvimento (Montpellier, França), pela parceria técnica e colaboração constante para o desenvolvimento deste trabalho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB) pelo auxílio financeiro concedido durante o desenvolvimento do trabalho.

Aos pesquisadores da Embrapa Mandioca e Fruticultura: Dra. Cláudia Fortes e Dr. Edson Amorim, pela orientação e disponibilidade.

À professora Dra. Edna Lôbo pela orientação e ensinamentos durante o decorrer do curso.

Aos meus pais Oderiana e Agnaldo por abdicarem de si por mim, inúmeras vezes. E à minha irmã amada Fenícia (Bibi). Vocês são tudo que me conforta quando suponho que nada tenho.

Um agradecimento especial aos meus felinos (Bernadete, Puma, Lázaro, Onça e Tigresa); às minhas músicas e livros, por me proporcionarem momentos de amor, serenidade, viagens e grandes aprendizados.

À todos da família Brito e Barreto que sempre torceram (e torcem) por mim. Amo vocês.

Aos meus amigos da vida: Thuany Mutti, Luzi Castro e Lorena Pimentel (yin yang né?!); e da faculdade: Adreani Conceição, Thaís Aline, Cátia Santana, Geralda Bispo (as pretinhas que amo); Beatriz Pimentel (muitos desesperos compartilhados); e Douglas Barros (o astrólogo profético indicador literário). Obrigada por tudo. Estarão comigo sempre.

Aos amigos do LBM/Embrapa: Maiane Marques, Vandesson Rodrigues, Seu Raimundão (vai ficar na saudade os papos políticos e de cunho social); Iane Queiroz e Luziane Brandão (seres espiritualmente elevados que amo), Priscila Silva (gótica que grita: vai safadão!), Gilmara Fachardo... e a todos os integrantes do LAB que sempre me deram amizade e apoio. Por fim e especialmente importantes: Claudinha (demônia), Paulo Henrique (migo lindo marido 1), Cátia Dias (mamãe, tu merecia um parágrafo só pra tu... Obrigada, obrigada!!!), Andresa Ramos (chefinha do amor).

À Camila Pestana, Vanusia Oliveira e Kátia Pestana pelo apoio e ensinamentos durante a execução do trabalho.

Aos funcionários queridos da Embrapa: Bety e Domingas por manterem o ambiente de trabalho limpo e organizado, mas principalmente pelo carinho, alegria e abraços apertados. Grata a S. Bizunga por sempre fechar comigo na hora das coletas.

Agradeço também aqueles amigos que conhecemos por acaso, mas fazem morada fácil: Camila Vieira (mano... #lagosta #sapodeladinho #cabodelan #ItáliaPadova) e Manassés Silva (migo lindo marido 2).

Enfim, obrigada a todos aqueles que fizeram parte desta jornada! Comemoremos a sua conclusão! Obrigada!

Todos os lugares que toquei
Todo ser que amei
Todas as coisas estão em mim

Toda vez que a dor me chamou
Toda vez que o sorriso voltou
Eu chorei, sim e sorri

Tudo me tornou maior
Tudo me diminuiu pra melhor.

Crof

RESUMO

BRITO SANTOS, DALMA, Bacharel em Biologia, Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, março de 2017. **Diversidade genética de espécies do vírus das estrias da bananeira (eBSV) em acessos da coleção de germoplasma da Embrapa Mandioca e Fruticultura.** Orientador: Edna Lobo Machado. Co-Orientador: Edson Perito Amorim.

A banana é uma das frutas mais consumidas no mundo, apresentando relevante papel sócio-econômico em inúmeros países tropicais e subtropicais. Diferente do cenário mundial, o Brasil concentra sua produção em cultivares do subgrupo Prata, em especial a ‘Prata-Anã’ e ‘Pacovan’, genótipos triploides com genoma AAB. Em bananeira, sabe-se que o genoma, ou pedaços do genoma do vírus das estrias da bananeira (BSV), podem estar incorporados ao genoma de bananeiras que possuem o grupo B em sua constituição. Sendo assim, são comuns os relatos de sintomas de BSV em bananais que fazem uso dessas cultivares, localizadas nos principais polos de produção da fruta no Brasil, o que leva a concluir-se pela presença do vírus integrado ao genoma B ou à infecção local por vetores. Para o agronegócio brasileiro da banana, é fundamental o uso de cultivares livres de sequências completas do vírus integrado no genoma B; demanda que pode ser atendida por meio do melhoramento genético baseado em cruzamentos e seleção nas progênies. Portanto, é de suma importância ter ferramentas disponíveis capazes de identificar partículas virais no germoplasma de bananeira para auxiliar a seleção de parentais livres do BSV. Dessa forma, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a diversidade genética das espécies de BSV presentes em acessos de bananeira mantidos no banco ativo de germoplasma da Embrapa Mandioca e Fruticultura (BAG-Banana), utilizando *primers* espécies-específicos (de junção, estruturais e alélicos) desenvolvidos pelo Centro de cooperação internacional em pesquisa agrônômica para o desenvolvimento (CIRAD-Montpellier, França). Foram analisados 304 acessos para detecção das principais espécies do vírus (BSGFV-*Goldfinger*, BSOLV-*Obino L’Ewai* e BSIMV-*Imové*). Destes, 142 acessos demonstraram resultados positivo para a existência de integrações virais em seus genomas (47% do germoplasma avaliado). Todos os acessos das espécies selvagens de bananeira e aqueles com apenas o genoma A, foram negativos; resultado que corrobora com a literatura internacional que vincula a integração do vírus apenas ao genoma B. As espécies virais mais frequentes na coleção de germoplasma foram BSGFV e BSOLV, presentes em aproximadamente 40% e 39%, respectivamente. Além dos *primers* espécies-específicos, também foram utilizadas enzimas de restrição (marcadores dCAPS – *Derived Cleaved Amplified Polymorphic Sequences*) para identificar acessos com genoma B que apresentam alelos virais infectivos ou não infectivos. Os resultados destas análises demonstraram que todos os acessos do grupo genômico BB apresentam alelos infecciosos para as espécies BSGFV ou BSOLV. Os resultados deste trabalho permitem estimar a diversidade de BSV (eBSV) nos acessos de bananeira pertencentes ao BAG-Banana da Embrapa-CNPMPF, bem como contribui para a aplicação de metodologias para a detecção do vírus em sua forma infecciosa, evitando sua propagação e potenciais surtos epidemiológicos.

Palavras-chave: *Musa* spp.; indexação; *Banana streak Goldfinger virus*; *Banana streak Obino l’ewai virus*; *Banana streak Imové virus*.

ABSTRACT

BRITO SANTOS, DALMA, Bacharel em Biologia, Universidade Federal do Recôncavo da Bahia. March, 2017. **Genetic diversity of banana streak vírus (eBSV) in accessions of the germplasm collection at Embrapa Cassava and Fruits.** Advisor: Edna Lôbo Machado. Co-Advisor: Edson Perito Amorim.

Bananas are one of the main consumed fruits worldwide playing a relevant social-economic role in many tropical and subtropical countries. Differently from the world scenario, Brazil concentrates its production in cultivars from the Prata subgroup, mainly ‘Prata-Anã’ and ‘Pacovan’, triploid genotypes with ABB genomes. In bananas, it is known that entire or pieces of the BSV genome may be incorporated in bananas with the B genome in its constitution. Therefore, reports of BSV symptoms are common in banana plantations that use these cultivars located in main banana production sites in Brazil which leads to the conclusion of the presence of the sequence of the virus integrated in the B genome, or its local infection by vectors. For the Brazilian banana agrobusiness the use of cultivars free of integrated sequences of the virus is mandatory, which can be obtained by genetic breeding based on crosses and selection of progenies. Therefore, it is important to use tools available capable of identifying viral particles in the banana germplasm to guide the selection of progenitors free of BSV. The objective of the present work was to evaluate the genetic diversity of BSV species in banana accessions in the germplasm bank at Embrapa Cassava and Fruits using species-specific primers (junction, structure and alleles) developed by CIRAD, Montpellier, France. 304 accessions were analyzed in order to identify the main species of BSV (BSGFV-Goldfinger, BSOLV-Obino L’Ewai e BSIMV-Imové). 142 accessions showed positive for integration of the genome of the vírus (47% of the germplasm evaluated). All accessions of the wild species of banana and those with genome A, were negative; results in agreement with the international literature which associates the integration of the virus only in B genomes. The most frequent viral species in the germplasm collection were BSGFV and BSOLV, present in approximately 40% and 39%, respectively. Besides the species-specific primers, restriction enzymes were also used (dCAPS markers - Derived Cleaved Amplified Polymorphic Sequences) to identify accessions with the B genome presenting infectious or non-infectious viral alleles. Results show that all accessions of the BB genomic group presented infectious alleles for the BSGFV or BSOLV species. Results enabled to estimate the BSV diversity (eBSV) in banana accessions from the BAG-Banana at Embrapa-CNPMF as well as contribute to the application of methodologies for the detection of the virus in its infectious form, avoiding its propagation and potential epidemiological spread.

Key-words: *Musa* spp.; indexing; *Banana streak Goldfinger virus*; *Banana streak Obino l’ewai virus*; *Banana streak Imové virus*.

ÍNDICE

Introdução	08
Objetivos	11
Material e Métodos	11
Resultados e Discussão	15
Conclusão	21
Referências Bibliográficas	22

Diversidade genética de espécies do vírus das estrias da bananeira (eBSV) em acessos da coleção de germoplasma da Embrapa Mandioca e Fruticultura

1. Introdução

As bananeiras e os plátanos pertencem ao gênero *Musa* e apresentam notável importância comercial e nutricional. Por seu valor nutritivo, é considerada a quarta cultura mais importante do mundo, abaixo somente do arroz, trigo e milho (MANZO-SÁNCHEZ et al., 2015). Em território brasileiro, trata-se da segunda fruta mais cultivada e consumida, a laranja ocupa o primeiro lugar. 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 2014 a produção mundial de banana foi de 114 milhões de toneladas, numa área de aproximadamente 5 milhões de hectares. O Brasil ocupa o quarto lugar no ranking mundial de produção de banana, produzindo aproximadamente 7 milhões de toneladas (FAOSTAT, 2017). 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. Atualmente, menos de 2% da produção nacional é exportada, para países como: Uruguai, Argentina, Reino Unido, Holanda, Alemanha e Espanha. Conseqüentemente, a maior parte da produção de banana no Brasil é voltada para consumo interno (TREICHEL et al., 2016).

A ampliação do mercado consumidor e a elevação de preço da banana que motivou a expansão da bananicultura em vários estados brasileiros, fato que vem causando uma grande procura por mudas de alta qualidade genética e fitossanitária, visando à produção de frutos de qualidade (OLIVEIRA et al., 2001).

No entanto, diversos fitopatógenos afetam a bananicultura como: fungos causadores da Sigatoka-amarela, Sigatoka-negra e mal-do-Panamá; bactérias como a causadora do Moko da bananeira; além dos nematóides (*Radopholus similis*); insetos, como os causadores da broca-do-rizoma (*Cosmopolites sordidus*); e os vírus, como o *Banana Streak Virus* (BSV), *Cucumber Mosaic Virus* (CMV), entre outros (SILVA et al., 2013).

Dentre estes, os vírus despontam como um dos principais problemas fitossanitários existentes, por serem importantes restrições à circulação e propagação de germoplasma,

especialmente para uma cultura propagada vegetativamente, como a bananeira (PÉRÉFARRES et al., 2009). Adicionalmente, tratando-se de agentes causadores de doenças virais, há escassez de variedades resistentes, poucas medidas curativas e grandes dificuldades em exterminar os vetores do vírus (FARIAS, 2016).

Dentre os vírus que afetam a cultura, o vírus das estrias da bananeira (BSV) vem destacando-se, principalmente por dificultarem o intercâmbio de germoplasma (FIGUEIREDO et al., 2006). O BSV pertence à família *Caulimoviridae* 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, por ação da enzima viral 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 a ORF I e II, codificam duas proteínas de função ainda desconhecida; a ORF III, codifica uma poliproteína que posteriormente é clivada em: RNase H, capa protéica, proteínas de movimento, transcriptase reversa e aspartyl protease (ALVES, 2013; ISKRA-CARUANA et al., 2014).

O principal sintoma da doença das estrias da bananeira são as estrias foliares cloróticas descontínuas que progressivamente tornam-se necróticas. Outros sintomas são observados, como: má formação dos frutos, 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). A transmissão do vírus pode ocorrer por meio de vetores de transmissão, que podem ser: pulgões, cigarrinhas, mosca branca, nematóides e as colchonilhas, sendo esta última, o vetor de transmissão mais comum. Esse tipo de transmissão viral é conhecido como transmissão horizontal. O segundo tipo de transmissão viral, é denominado de transmissão vertical e ocorre por meio de propagação vegetativa (NOUMBISSIE-TOUKO, 2014).

Uma importante característica do BSV é a sua capacidade de incorporar o seu genoma, ou partes dele, no genoma da bananeira, sendo denominado BSV endógeno (eBSV) ou pararetrovírus endógeno (EPRV). No entanto, este não é um evento essencial para o ciclo de replicação viral. Existem dois tipos de integração do BSV em *Musa* spp., um primeiro tipo é onde a sequência viral é incompleta e incapaz de causar a infecção. Essa sequência viral é considerada desfuncional e 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 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. balbisiiana* (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 de *Musa* sp., 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). Portanto, como a bananeira é uma planta que se propaga vegetativamente, é de suma importância ter-se disponível ferramentas moleculares capazes de identificar partículas virais com potencial de causar doença no germoplasma de bananeira no Brasil, para subsidiar a seleção de parentais livres das sequências integradas do BSV para uso em cruzamentos (SILVA et al., 2013).

Alguns métodos atuais 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 desfuncionais, gerando resultados falso-positivos. Além disso, são técnicas morosas e custosas (FIGUEIREDO et al., 2006; ALVES, 2013).

Recentemente, o grupo de pesquisadores do CIRAD (Centro de Cooperação Internacional em Pesquisa Agronômica para o Desenvolvimento) – Montpellier, França; desenvolveram três classes de *primers* espécie-específicos capazes de detectar as integrações virais e diferenciar as principais espécies do vírus das estrias da bananeira (BSV) comumente encontradas no genoma de bananeira: *Banana streak Goldfinger virus* (BSGFV), *Banana streak Obino l'Ewai virus* (BSOLV) e *Banana streak Imove Virus* (BSIMV) (CHABANNES et al., 2013). Esta abordagem metodológica é potencialmente mais eficiente, pois permite conhecer a diversidade genética das espécies de BSV presente nos acessos avaliados, visando à elaboração e refinamento de metodologias eficazes para rápida identificação das espécies virais presentes nos acessos do banco ativo de germoplasma da Embrapa Mandioca e Fruticultura.

2. Objetivos

2.1. Objetivo Geral

- Avaliar a diversidade genética das espécies de BSV (Vírus das Estrias da Bananeira) presentes em acessos de bananeira mantidos no banco ativo de germoplasma de banana da Embrapa Mandioca e Fruticultura, localizado em Cruz das Almas (BA).

2.2. Objetivos específicos

- Avaliar a eficiência de *primers* espécie-específicos desenvolvidos pelo grupo de virologistas do CIRAD (Montpellier, França) na detecção das sequências endógenas do BSV nos acessos analisados;
- Verificar a existência de integrações virais nos acessos diplóides de genoma B presentes na coleção de germoplasma de banana da Embrapa Mandioca e Fruticultura para identificação de acessos contendo alelos não-infecciosos para uso no programa de melhoramento da bananeira na instituição.

3. Material e métodos

3.1 Material vegetal e extração de DNA

Foram coletadas 304 amostras de folhas jovens de bananeiras, pertencentes ao Banco Ativo de Germoplasma de Banana (BAG-Banana), da Embrapa Mandioca e Fruticultura em Cruz das Almas - BA. Estas, foram envolvidas em papel alumínio, identificadas e mantidas refrigeradas até o momento da extração do DNA.

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 mg.L⁻¹) por comparação visual de diversas concentrações de DNA do fago Lambda (Invitrogen). A eletroforese foi realizada em tampão TBE 0,5 x (45 mM Tris-borate, 1 mM EDTA e q.s.p de água destilada) visualizados em Luz UV e registradas com o fotodocumentador Gel Logic 212 Pro (Carestream Molecular Imaging).

3.2 Descrição dos primers espécie-específicos

Para a análise de diversidade viral 23 *primers* espécie-específicos (Tabela 1), divididos em três categorias referentes à região de acesso no genoma viral e/ou vegetal foram utilizados: 1) *primers* de junção (que acessam a região de junção entre o genoma viral e o de *Musa*); 2) *primers* internos ou estruturais (acessam apenas o genoma viral integrado na planta); e 3) *primers* alélicos (capazes de diferir os alelos virais de uma mesma espécies viral) (Figura 1). Importante resaltar que os *primers* alélicos distinguem os alelos virais infecciosos: eBSGFV-7 (*Banana streak Goldfinger Virus* - alelo 7) e eBSOLV-1 (*Banana streak Obino l'Ewai virus* – alelo 1) dos alelos virais não-infecciosos: eBSGFV-9 (*Banana streak Goldfinger Virus* - alelo 9) e eBSOLV-2 (*Banana streak Obino l'Ewai virus* – alelo 2) (NOUMBISSIE-TOUKO, 2014). Os alelos da espécie viral *Banana streak Imové virus* (eBSIMV) não podem ser diferenciados, uma vez que os dois alelos são estruturalmente idênticos (CHABANNES et al., 2013).

Tabela 1. Relação de primers espécie-específicos, capazes de detectar as integrações de três espécies virais *Banana streak Goldfinger virus* (BSGFV); *Banana streak Obino l'Ewai virus* (BSOLV); *Banana streak Imové vírus* (BSIMV) utilizados na análise de diversidade em 304 acessos de banana pertencentes ao Banco de Germoplasma de Banana, da Embrapa Mandioca e Fruticultura, Cruz das Almas – BA, 2016.

Espécie viral	Classe	Primers	Peso molecular (pb)	TM
eBSGFV	Junção	VM1	481	60 °C
		VM2	374	60 °C
	Internos/ Estruturais	VV1	268	60 °C
		VV2	639	60 °C
		VV3	376	60 °C
		VV4	784	60 °C
		VV6	264	60 °C
	Alélico eBSGFV-7	DifGF	670	60 °C
	Alélico eBSGFV-9	VV5	628	60 °C

Espécie viral	Classe	Primers	Peso molecular (pb)	TM
eBSOLV	Junção	Musa 01 (16/17)	563	60 °C
		Musa 02 (25/26)	590	60 °C
	Intemos/ Estruturais	Sig 1	606	60 °C
		Sig 2	426	60 °C
	Alélico eBSOLV-1	Marker 2 - BSOLV1 (23/24)	1463	65 °C
	Alélico eBSOLV-2	Marker 1 - BSOLV 2 (18/19)	601	65 °C
	Alélico eBSOLV-2	Marker 2 - BSOLV 2 (20/21)	399	60 °C
	Alélico eBSOLV	Dif-OL (Hae III)	337	65 °C
	Alélico eBSOLV	Dif-OI (AhdI)	500	60 °C
eBSIMV	Junção	Musa/F2	561	60 °C
		Musa/F5	594	60 °C
	Intemos/ Estruturais	F1/F3	490	60 °C
		F3/F4	600	60 °C
		F4/F5	540	60 °C

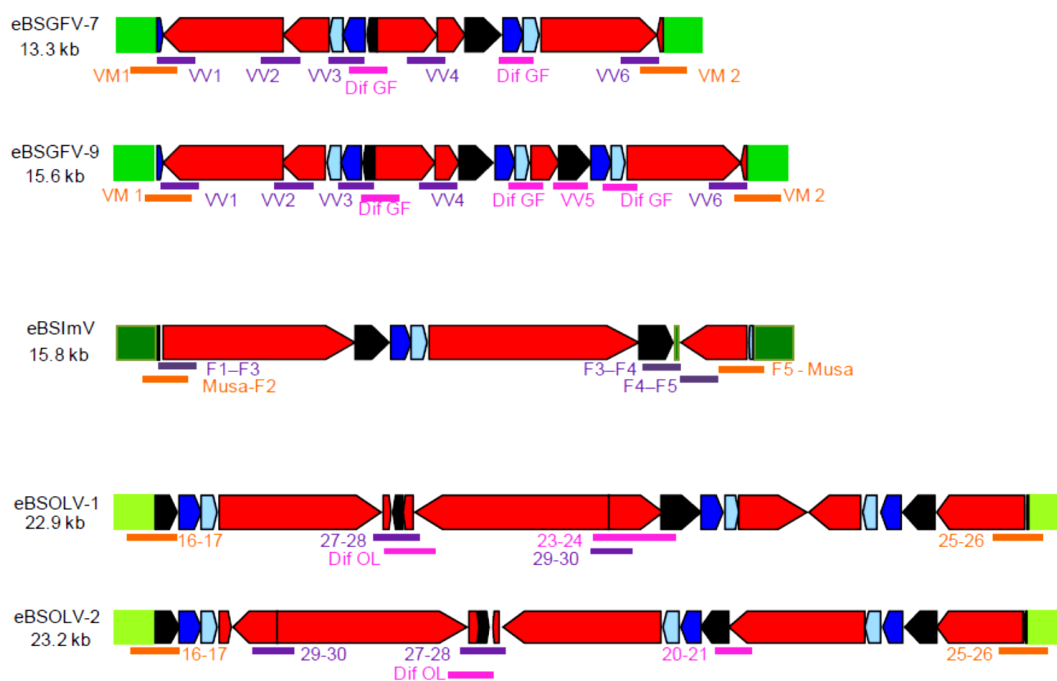


Figura 1. Representação do genoma de três espécies do vírus das estrias da bananeira: BSGFV, BSIMV e BSOLV, respectivamente. Os retângulos nas cores azul escuro, azul claro e vermelho representam as ORFs 1, 2 e 3, respectivamente, no genoma viral. O retângulo verde representa o genoma da bananeira. Os traços na cor laranja representam os *primers* de junção, a cor lilás representa os *primers* internos/estruturais; e a cor rosa os *primers* alélicos. Em preto estão representadas as regiões intergênicas.

Fonte: NOUMBISSIE-TOUKO, 2014.

3.3 Detecção de integrações virais com primers estruturais e de junção

As reações de amplificação foram completadas para volume final de 15 µL, contendo: Tampão 5x (Promega), dNTPs 0,2 mM, 0,2 µM de cada primer espécie-específico (IDT), e 0,2 µM de primer 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 (Quadro 1) (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⁻¹). Os fragmentos

amplificados foram fotografadas utilizando fotodocumentador Gel Logic 2200 Pro. Os tamanhos dos fragmentos foram determinados baseados em padrão molecular de 1 Kb (DNA Ladder Biolabs).

3.4 Detecção de alelos infecciosos com primers alelo-específicos

Foram selecionados oito acessos de bananeira do Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa Mandioca e Fruticultura para análise com *primers* alélicos, para detectar a presença/ausência de alelos infectivos do BSV. Esses acessos correspondem aos acessos do grupo genômico BB, que tem potencial para uso em cruzamentos visando o desenvolvimento de cultivares dos tipos Prata e Maçã.

As reações de amplificação para os *primers* alélicos foram realizadas com as mesmas condições e reagentes utilizados para amplificação com primers de junção e estruturais, descritas acima. 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 (Fermentas) respectivamente, de acordo com as instruções dos fabricantes.

O DNA digerido foi separado em gel de agarose 2,5% em tampão TBE 0.5X e corados com brometo de etídio (0.5 µl mL⁻¹). Os fragmentos amplificados foram fotografados utilizando fotodocumentador Gel Logic 2200 Pro e analisados conforme padrões de bandas esperados para primers específicos (Quadro 1) (CHABANNES et al., 2013; GAYRAL e ISKRA-CARUANA, 2009) baseados em padrão molecular de 1 Kb (DNA Ladder Biolabs).

4. Resultados e discussão

4.1. Detecção de sequências endógenas do BSV

Dos 304 acessos de bananeira do Banco Ativo de Germoplasma analisados, 142 foram PCR positivos para integrações do vírus das estrias da bananeira (BSV), correspondendo a aproximadamente 47% do germoplasma avaliado (Tabela 2).

Tabela 2. Indexação de 304 indivíduos para BSV usando *primers* espécie-específicos de junção e estruturais pertencentes ao banco ativo de germoplasma de banana da Embrapa Mandioca e Fruticultura, organizados por grupo genômico, Cruz das Almas-Ba, 2017.

Grupo genômico	N	Positivo	Negativo	Integrações únicas			Integrações mistas			
				GF	OL	IM	(GF + OL)	(GF + IM)	(OL + IM)	(GF + OL + IM)
AA	90	0	90	0	0	0	0	0	0	0
AAA	61	0	61	0	0	0	0	0	0	0
AAAA	6	0	6	0	0	0	0	0	0	0
AAAB	45	45	0	3	2	0	30	1	7	2
AAB	64	64	0	14	11	0	24	2	1	12
AABB	2	2	0	0	0	0	0	0	0	2
AB	2	2	0	0	0	0	1	0	0	1
ABB	20	20	0	0	0	0	4	1	0	15
ABBB	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0
BB	8	8	0	0	0	0	1	1	0	6
ES	5	0	5	0	0	0	0	0	0	0
Total	304	142	162	17	13	0	61	5	8	38

N = número de amostras; GF (GoldFinger), OL (Obino l'Ewai) e IM (Imové), correspondem as espécies virais: *Banana streak Goldfinger virus*, *Banana streak Obino l'Ewai virus* e *Banana streak Imové virus*, respectivamente. ES = espécie selvagem.

Os acessos com resultado positivo são em sua maioria híbridos entre as espécies *M. balbisiana* (genoma B) e *M. acuminata* (genoma A). Estudos recentes sugerem que os primeiros eventos de integração viral ocorreram em espécies de *M. balbisiana* (genoma B), por meio de um processo de co-evolução entre o vírus e a bananeira (ISKRA-CARUANA et al., 2014). Após, as primeiras infecções virais, eventos maciços de integração do vírus no genoma de bananeiras selvagens ocorreram, conferindo resistência/tolerância ao vírus para a espécie *M. balbisiana*. 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 três espécies virais (BSGFV, BSOLV e BSIMV) e não apresenta sintomas da doença das estrias da bananeira (CHABANNES et al., 2013).

Supostamente, a seleção humana por híbridos interespecíficos contendo o genoma B, ajudou a manter a atividade viral endógena que resultou em alguns surtos globais de BSV nos últimos 20 anos (ISKRA-CARUANA et al., 2014). Dessa forma os resultados obtidos neste trabalho corroboram com o que foi descrito por Gayral et al. (2008); Chabannes et al. (2013) e Iskra-Caruana et al. (2014), de que as sequências endógenas do BSV, capazes de

causar infecção na planta, são encontradas apenas em espécies de bananeira que apresentam o genoma B.

Dos 142 acessos com resultado positivo, 30 (aproximadamente 10% do germoplasma avaliado), pertencentes ao grupo genômico AAB e AAAB, apresentaram integrações de apenas uma espécie viral, sendo 17 acessos com integrações da espécie viral BSGFV (*Banana streak Goldfinger virus*) e 13 da espécie viral BSOLV (*Banana streak Obino l'Ewai virus*) (Tabela 2).

Integrações mistas (mais de uma espécie viral no genoma das bananeiras), também foram observadas. Do total de acessos com resultado positivo, 112 apresentaram integrações mistas, correspondendo a aproximadamente 37% do germoplasma avaliado. O tipo de integração mista mais comum, foi para as espécies BSGFV e BSOLV, presentes em 61 acessos, e o tipo de integrações mistas menos frequentes, foram entre as espécies BSGFV e BSIMV, presente em apenas cinco acessos do banco ativo de germoplasma.

Poucos trabalhos foram encontrados relatando diferenças na virulência entre as espécies distintas de BSV. Wambulwua et al., (2013) descrevem que existe relação entre o tipo viral e a severidade dos sintomas observados na planta. Os autores avaliaram a expressão de sintomas entre três espécies virais de BSV e concluíram que a espécie viral BSMYV (*Banana streak Mysore virus*) apresenta maior grau de virulência quando comparada às espécies BSGFV e BSOLV. Portanto, se faz importante identificar o tipo de integração viral como suporte para decisões futuras dentro do programa de melhoramento. No entanto, vale ressaltar que a ativação viral depende das condições bióticas e abióticas as quais as plantas estejam submetidas. De acordo com Alves (2013) determinadas condições de estresse, como estresse hídrico e ocasionados por subcultivos de mudas *in vitro*, podem desencadear eventos de recombinação nas sequências integradas, resultando em infecções epissomais. Portanto, podemos inferir que apesar das diferenças de virulência entre as espécies virais, qualquer espécie viral em condições ambientais de estresse poderão desencadear a infecção.

Resultado negativo para integrações virais foram observados em 162 acessos, correspondendo a aproximadamente 53% do germoplasma avaliado (Tabela 2). Deste total, 157 acessos correspondem a espécies de *M. acuminata* (genoma A). Apesar de integrantes virais incompletos, formados por sequências rearranjadas e parcialmente invertidas e incapazes de dar origem a infecção, serem encontradas integradas em bananeiras de genoma A (NDOWORA et al. 1999), todos os genótipos de *M. acuminata* do BAG-Banana da

Embrapa Mandioca e Fruticultura apresentaram resultado negativo para as espécies virais estudadas.

As cinco espécies selvagens (ES) analisadas: *Musa coccinea* (Andrews), *Musa ornata* (Roxb.), *M. ornata* x *Musa velutina* (H. Wendl. & Drude), *Musa laterita* (Cheesman) e Bronze correspondem a espécies ornamentais e apresentaram resultado negativo para todas as três espécies virais avaliadas (BSGFV, BSOLV e BSIMV). Como são constantemente propagadas para sua conservação e usadas no programa de melhoramento da instituição, o fato de não apresentarem nenhum tipo de sequência viral (eBSV), é vantajoso por evitar a utilização de mudas que por ventura possam ativar sequências do BSV em seus genomas e consequentemente virem a apresentar a doença.

4.2. Primers alélicos – diplóides BB

Nas análises dos oito acessos diploides de genoma B presentes no banco ativo de germoplasma, por meio dos *primers* endógenos (junção e estruturais), todos os acessos apresentam integrações virais mistas, sendo integrações entre as três espécies virais (BSGFV, BSOLV e BSIMV) as mais comuns, encontradas em seis acessos. Os acessos BB França (BGB 058) e BB IAC (BGB 056), apresentaram integrações mistas entre as espécies virais BSGFV+BSOLV e BSGFV+BSIMV, respectivamente (Tabela 3).

Tabela 3. Resultado das análises com *primers* endógenos (junção e estruturais) e alélicos nos oito acessos do grupo genômico BB do BAG-Banana da Embrapa Mandioca e Fruticultura.

BGB	ACESSO	PRIMERS						
		ENDÓGENOS			ALÉLICOS			
		GF	OL	IM	GF-7	GF-9	OL-1	OL-2
BGB 301	Monthan (ITC1483)	1	1	1	0	1	1	1
BGB 076	Musa balbisiana	1	1	1	1	1	1	0
BGB 073	BB Panamá	1	1	1	1	1	1	1
BGB 058	BB França	1	1	0	1	1	1	1
BGB 059	Butuhan	1	1	1	1	0	1	0
BGB 061	Diploide da Belgica	1	1	1	1	1	1	0
BGB 074	Balbisiana Franca	1	1	1	1	1	1	0
BGB 056	BB IAC	1	0	1	1	0	1	0

GF =BSGFV; OL = BSOLV; IM = BSIMV; GF-7 = eBSGFV-7 (alelo infeccioso); GF-9 = eBSGFV-9; OL-1 = eBSOLV-1 (alelo infeccioso); OL-2 = eBSOLV-2.

Estes diploides de genoma B, tem potencial para uso em cruzamentos visando o desenvolvimento de cultivares dos tipos Prata e Maçã. Diante do exposto e com base no resultado anterior, faz-se necessário avaliar se as integrações virais encontradas nestes acessos correspondem aos alelos infecciosos das espécies em questão. Portanto, por meio de *primers* alélicos, capazes de diferir os alelos de uma mesma espécie viral, observou-se que todos os oito acessos BBs apresentam o alelo viral infeccioso (eBSOLV-1) para a espécie BSOLV. Apenas o acesso Monthan (BGB 301) não apresentou o alelo infeccioso (eBSGFV-7) para a espécie viral BSGFV. Todos os outros sete acessos foram positivos para a presença deste correspondente infeccioso relacionado à espécie BSGFV (Figura 2). Logo, todos os acessos apresentam pelo menos um alelo infeccioso em seus genomas.

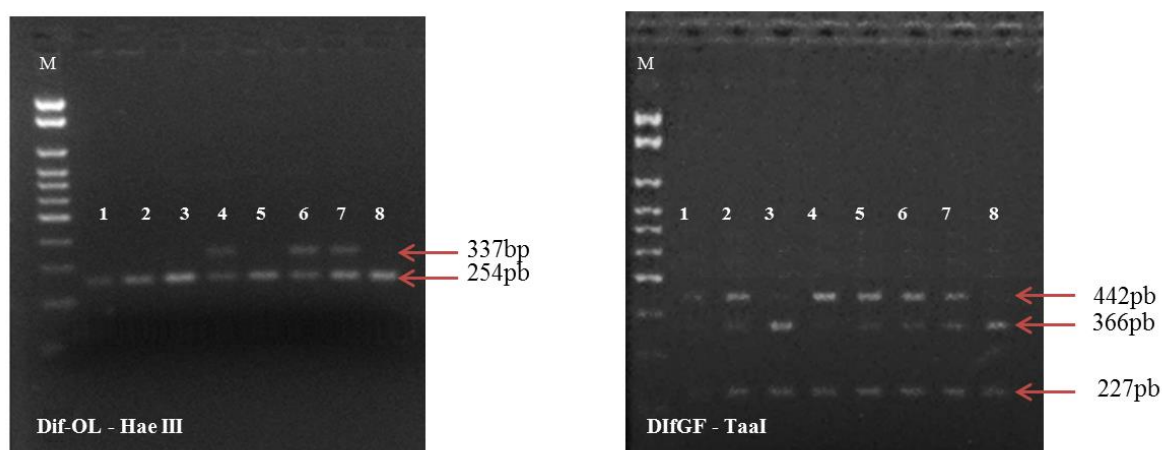


Figura 2. Perfil eletroforético de oito acessos do grupo genômico BB, analisados com *primers* alelo-específicos associados a enzimas de restrição: Dif-OL – Hae III (específico para BSOLV) gerando 2 fragmentos eletroforéticos, um de 337pb referente ao alelo eBSOLV-9 e um de 254pb, referente ao alelo infeccioso eBSOLV-7; e o primer DifGF - TaaI (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 alelos virais da espécie BSGFV; presença dos fragmentos 227pb e 366pb refere-se ao alelo viral infeccioso (eBSGFV-7) e a presença dos fragmentos de 227pb e 442pb refere-se ao alelo viral eBSGFV-9, não-infeccioso. Acessos: 1) BGB301 – Monthan; 2) BGB076 – Musa balbisiana; 3) BGB073 – BB Panamá; 4) BGB058 – BB França; 5) BGB059 – Butuhan; 6) BGB061 – Diplóide da Bélgica; 7) BGB074-Balbisiana França; 8) BGB056 – BB IAC.

Apesar do resultado encontrado, os oito acessos do grupo genômico BB foram analisados via técnica IC-PCR+DNase, em pesquisa conduzida pelos virologistas do CIRAD (Montpellier – França). Estes mesmos virologistas aprimoraram a técnica do IC – PCR acrescentando uma etapa com o uso de DNase. Essa etapa permite que todo o DNA da

bananeira seja digerido, deixando apenas o DNA do vírus (encapsulado via IC – PCR) a ser analisado, caso esteja presente, assim eliminando resultados falsos positivos (trabalho em submissão – comunicação pessoal com os autores). Uma vez dominada, essa nova metodologia poderá ser usada na indexação do BSV em genótipos e mudas a serem plantadas. Como resultado desta análise, obteve-se a informação de que todos os acessos apresentaram resultado negativo para o vírus epissomal (denominação utilizada para referir-se ao vírus na sua forma não integrada, ou seja, o DNA do vírus permanece circular no núcleo da célula do hospedeiro, sem integrar-se ao DNA nuclear), indicando que apesar destes acessos apresentarem alelos infecciosos, estes não estão ativos (dados não publicados – informação cedida pelos autores), resultado favorável para o Programa de Melhoramento da Embrapa Mandioca e Fruticultura.

4.3 Perspectivas para a cultura da bananeira em relação ao BSV

A validação dos *primers* espécie-específicos nos acessos do BAG-Banana em contrapartida às limitações dos testes sorológicos e dos testes moleculares com uso de *primers* não específicos é importante, pois permite uma maior confiabilidade aos resultados. Além disso, a capacidade dos *primers* alelo-específicos em distinguir os alelos virais infecciosos dos não infecciosos é extremamente vantajoso, pois os acessos de genoma BB são constantemente utilizados em cruzamentos dentro do programa de melhoramento por fornecer características de resistência aos híbridos produzidos. Portanto, identificar quais acessos de genoma B possuem alelos infecciosos/não infecciosos, é útil para evitar a disseminação da doença. Desta forma, a detecção de sequências virais de BSV e distinção de alelos virais em bananeiras que possuem o genoma B, contribuem para o melhoramento da cultura uma vez que cultivares sem a presença de alelos infecciosos podem ser desenvolvidos evitando problemas futuros aos produtores.

Em relação ao BAG-Banana, os dados sobre quais acessos apresentam integrações virais e/ou alelos infecciosos acrescentam mais uma informação ao passaporte dos acessos. Assim, a possibilidade de propagação da doença das estrias da bananeira pelo cruzamento de cultivares que apresentam alelos infecciosos do vírus pode ser evitada.

O conhecimento sobre a diversidade do vírus das estrias da bananeira nos acessos do BAG-Banana pode ajudar a estimar o quão disseminada está a doença no país e dessa forma contribuirá 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, como em Ruanda, Burundi, Tanzânia e principalmente em Uganda (ISKRA-CARUANA et al. 2014).

5. Conclusões

- A metodologia empregada é eficiente, pois permite detectar as integrações virais no genoma das bananeiras e conhecer as diferentes espécies do vírus presentes nos acessos da coleção de germoplasma de banana da Embrapa Mandioca e Fruticultura.
- A identificação de acessos de banana da coleção de germoplasma da Embrapa sem a presença de alelos infecciosos (ativos), do vírus das estrias da bananeira (BSV) contribui para o desenvolvimento de cultivares livres do vírus a partir do uso desse germoplasma em cruzamentos.

Referências bibliográficas

- ALVES, P. C. M. S. **Detecção e caracterização molecular de isolados de Banana Streak Virus (BSV) no Brasil.** 74p. Dissertação (Biotecnologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras. Lavras – Minas Gerais, 2013.
- CHABANNES, M. et al. Three infectious viral species lying in wait in the banana genome. **Journal of Virology**, v. 87, p. 8624-8637, 2013.
- 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.
- 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 Statistics. Disponível em < <http://www.fao.org/faostat/en/#home>> Acesso: 12 de fevereiro de 2017.
- FARIAS, A. R.G. **Diagnose e caracterização molecular de espécies de Badnavirus que causam a estria da bananeira no Brasil.** p.56. Dissertação (Agronomia). Universidade Federal de Lavras. Minas Gerais, 2016.
- FIGUEIREDO, D. Detecção e análise da variabilidade de sequências do Banana streak vírus (BSV) em Bananeiras no Brasil. **Summa Phytopathologica**, v. 32, n. 2, p. 118-123, Botucatu – São Paulo, 2006.
- GAYRAL, P. et al. 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.

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

GEERING, A. D. et al. Analysis of the distribution and structure of integrated Banana streak virus DNA in a range of *Musa* cultivars. **Molecular Plant Pathology**, v. 2 (4), p. 207-213, 2001.

GEERING, A. D. W. et al. Banana contains a diverse array of endogenous badnaviruses. **Journal of General Virology**, v. 86, p. 511-520. 2005.

HARPER, G. et al. The diversity of Banana streak virus isolates in Uganda. **Archives of Virology**, v. 150, p. 2407-2420. 2005.

ISKRA-CARUANA et al. A possible scenario for the evolution of Banana streal vírus in banana. **Virus Research**, v. 186, p. 155-162, 2014.

MANZO-SÁNCHEZ, G. et al. Genetic Diversity in Bananas and Platains (*Musa* spp.). In: CALISKAN, M. **Molecular Approaches to Genetic Diversity**. ISBN 978-953-51-2042-1; InTech. 2015.

NOUMBISSIE-TOUKO G.B. **Ségrégation des chromosomes dans um 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 en Sciences Agronomiques de Montpellier. França, 2014.

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

OLIVEIRA, R. P. et al. Concentração de BAP e a eficiência de micropropagação de bananeira tetraploide (grupo AAAB). **Scientia Agricola**, v. 58, n. 1, p. 73-78. Piracicaba, São Paulo, 2001.

PÉRÉFARRES, F.; PROVOST, G. Le; ACINA, I. et al. Detection, Incidence and diversity of banana streak viroses, banana mild mosaic vírus and banana vírus X in Guadeloupe. **Acta Horticulturae**, v. 828, p. 205-212. 2009.

RIBEIRO, L. R. et al. 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'ANNA, M. M. **Ocorrência do Banana streak virus (BSV) e do Cucumber mosaic virus (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. Melhoramento genético da bananeira: estratégias e tecnologias disponíveis. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 35, n. 3, p. 919-931. Jaboticabal – São Paulo, 2013.

TREICHEL, M. et al. **Anuário brasileiro da fruticultura.** Editora Gazeta Santa Cruz, p.88. ISSN 1808-4931. Santa Cruz do Sul, 2016.

WAMBULWA, M. C. et al. The influence of host and pathogen genotypes on symptom severity in banana streak disease. **African Journal of Biotechnology**, v. 12 (1), p. 27-31. 2013.