

# Detecção e análise da variabilidade de seqüências do *Banana streak virus* (BSV) em Bananeiras no Brasil

Daniel Figueiredo<sup>1,\*,\*\*</sup>, Paulo Meissner Filho<sup>2</sup>, Sebastião Silva Neto<sup>3</sup>; Paulo Brioso<sup>1,\*\*</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Virologia Vegetal e Viróides/DenF/IB/UFRRJ, Caixa Postal 74585, 23851-970, Seropédica, RJ, <brioso@bigghost.com.br>; <sup>2</sup>EMBRAPA/CNPMPF, Caixa Postal 007, 44380-000, Cruz das Almas, BA; <sup>3</sup>CAMPO Biotecnologia Vegetal Ltda. Caixa Postal 250, 38600-000, Paracatu MG.

\* Parte da dissertação de Mestrado do primeiro autor, Pós-Graduação em Biotecnologia Vegetal/UFRJ; \*\* Bolsista do CNPq. Data de chegada: 23/03/2004. Aceito para publicação em: 20/09/2004.

1057

## ABSTRACT

Figueiredo, D.V.; Meissner Filho, P.E.; Silva Neto S. P.; Brioso, P.S.T. Detection and analysis of *Banana streak virus* (BSV) sequences variability of banana from Brazil. *Summa Phytopathologica*, v.32, n. 2, p. 118-123, 2006.

PCR assay using degenerate primers, designed to *Badnavirus* genus, was used to detect and analyse the variability of BSV strains sequences from banana. The virus was detected in diploid (AA), triploids (AAA; AAB) and tetraploids (AAAB) banana cultivars. Four BSV sequences patterns (BSVBR-1, BSVBR-2, BSVBR-3 and BSVBR-4 strains) were found, and distinguished by eletrophoresis. The strain BSVBR-1 was found in the states of Acre, Amazonas,

Bahia, Ceará, Goiás, Minas Gerais, Piauí, Rio de Janeiro, Rondônia, Santa Catarina and São Paulo, while BSVBR-2 strain was detected in the states of Amazonas and Ceará. BSVBR-3 and BSVBR-4 strains were found only in the state of Ceará. This work demonstrated the presence of different BSV strains in Brazil and the existence of health banana cultivars as well as cultivars free of BSV integrated sequences.

Additional keywords: *Musa* spp., “Polymerase Chain Reaction”, PCR.

## RESUMO

Figueiredo, D.V.; Meissner Filho, P.E.; Silva Neto, S.P.; Brioso, P.S.T. Detecção e análise da variabilidade de seqüências do *Banana streak virus* (BSV) em bananeiras no Brasil. *Summa Phytopathologica*, v.32, n. 2, p. 118-123, 2006.

A técnica de PCR utilizando-se “primers” degenerados para o gênero *Badnavirus* foi utilizada para a detecção e análise da variabilidade de seqüências do *Banana streak virus* (BSV) provenientes de bananeiras. A partir desta metodologia seqüências do vírus puderam ser detectadas em cultivares diplóides (AA), triplóides (AAA; AAB) e tetraplóides (AAAB). Foram encontrados quatro padrões de seqüência do BSV (estirpes BSVBR-1, BSVBR-2, BSVBR-3 e BSVBR-4), diferenciadas através da análise do perfil eletroforético

das amostras amplificadas. A estirpe BSVBR-1 prevalece nos estados do Acre, Amazonas, Bahia, Ceará, Goiás, Minas Gerais, Piauí, Rio de Janeiro, Rondônia, Santa Catarina, e São Paulo, enquanto que, a estirpe BSVBR-2 foi encontrada em amostras oriundas do Amazonas e do Ceará. As estirpes BSVBR-3 e BSVBR-4 foram encontradas apenas no Ceará. Este trabalho revela a presença de diferentes estirpes do BSV no Brasil, bem como a existência de cultivares de bananeiras sadias e livres de seqüências virais do BSV integradas ao seu genoma.

Palavras-chave adicionais: *Musa* spp., “Polymerase Chain Reaction”, PCR.

A bananeira (*Musa* spp.) é uma das fruteiras mais cultivadas nos países tropicais e seus frutos representam a quarta mais importante mercadoria comercializada no mundo (8). O Brasil destaca-se como o segundo produtor mundial (11).

O *Banana streak virus* (BSV) tem se tornado um dos mais importantes vírus em bananeiras e plátanos por ser distribuído

em mais de 40 países da África, Ásia, Europa, Oceania e Américas do Sul e Central (10) e pelo fato de evidências indicarem a integração de seqüências do genoma de *Musa*, causando problema no intercâmbio de germoplasma (6, 7, 12).

O *Banana streak virus* pertence ao gênero *Badnavirus*, estando atualmente classificado na família *Caulimoviridae* (14).

É disseminado na natureza de forma não circulativa pelas cochonilhas *Planococcus citri* Russo e *Saccharicoccus sacchari* Ckll (Hemiptera: Pseudococcidae). As partículas virais são baciliformes, não envelopadas, medindo de 120 a 150 nm de comprimento por 23 a 30 nm de diâmetro, contendo um dsDNA circular de aproximadamente 7,4 kpb (14).

As bananeiras infectadas com o BSV podem apresentar sintomas de riscas foliares, lesões foliares cloróticas, mosaico, má formação dos frutos e diminuição do cacho (10). Tais sintomas podem ser confundidos com aqueles causados pelo *Cucumber mosaic virus* (CMV), e aparecem esporadicamente, podendo estarem ausentes por muitos meses (9).

Segundo Lockhart & Olszewski (9), os principais métodos disponíveis para a indexação de vírus em bananeiras e em plântanos são a inspeção visual, baseada na observação de sintomas; detecção por microscopia eletrônica das partículas virais em extratos; indexação biológica; detecção do dsRNA viral por eletroforese e métodos sorológicos. Entretanto, tais metodologias podem levar a resultados falsos negativos quando aplicadas na detecção do BSV. Além disto, o BSV apresenta um alto grau de heterogeneidade genômica e sorológica entre seus isolados (9). Tal heterogeneidade impõe uma séria restrição quanto a utilização de técnicas sorológicas e moleculares para a sua detecção em germoplasma de *Musa*.

No mundo, o BSV foi descrito infectando bananeiras dos grupos AA, AB, AAA, AAB, AABB e AAAB. No Brasil, o BSV só foi relatado nas cultivares Mysore e Pacovan (AAB) e, até o momento, nenhuma técnica molecular de diagnóstico tem sido empregada para a detecção e controle deste vírus no território nacional (2, 10). Em vista disso, este trabalho teve por objetivo detectar e analisar a variabilidade de seqüências do BSV amplificadas por PCR, provenientes de onze estados brasileiros.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Coleta de amostras

Amostras foliares de bananeira de diferentes cultivares, oriundas do campo e de cultura de tecido, com ou sem sintomas, foram coletadas em diferentes localidades dos estados do Acre, Amazonas, Bahia, Ceará, Goiás, Minas Gerais, Piauí, Rio de Janeiro, Rondônia, Santa Catarina e São Paulo, sendo acondicionadas em sacos plásticos, etiquetadas e mantidas à temperatura de -20 °C até uso.

Como controle positivo foi utilizado um isolado do BSV oriundo de folhas infectadas de bananeira 'Mysore', proveniente de Piracicaba (SP), em infecção mista com o *Cucumber mosaic virus* (2).

### Extração do DNA total de bananeira

Na purificação do DNA total das amostras coletadas foi utilizado o produto DNazol (Life Technologies do Brasil Ltda), e a metodologia do processo foi realizada conforme a recomendação do fabricante. Na quantificação do DNA total extraído foi adotado o coeficiente de densidade óptica (DO), onde 1 DO corresponde a 50 µg DNA/ml ao comprimento de onda de 260 nm (13). O produto extraído foi visualizado através de eletroforese, à voltagem constante de 80 volts por 30 minutos, à temperatura ambiente, em gel de agarose a 1 % (p/v) contendo brometo de etídio (5 µg/ml).

### Teste de PCR

Para a reação de PCR foram adicionados em um tubo de polipropileno (0,2 ml) 5 µl de tampão 10X PCR da enzima *Taq* DNA polimerase, 3 µl da mistura de dNTP (2,5 mM dATP + 2,5 mM dCTP + 2,5 mM dGTP + 2,5 mM dTTP), 50 pmoles do oligonucleotídeo "BADNA 2" (1) e 50 pmoles do oligonucleotídeo "MYS 3'" (1), 2 µl de MgCl<sub>2</sub> 50 mM, 1.25 U DNA polimerase (*Taq* DNA pol, Life Technologies do Brasil Ltda), 100 ng de DNA e água destilada estéril para 50 µl de volume final. O tubo foi colocado no termociclador programável PTC-200 (MJ Research), realizando um ciclo inicial de 94 °C/5 minutos, 42 °C/2 minutos, 72 °C/3 minutos; 25 ciclos de 94 °C/1 minuto, 42 °C/2 minutos, 72 °C/3 minutos e, um ciclo final de 94 °C/1 minuto, 42 °C/2 minutos, 72 °C/10 minutos.

Os produtos amplificados foram visualizados através de eletroforese em gel de agarose a 1,0 % (p/v), contendo brometo de etídio.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

No levantamento nacional parcial foram coletadas 95 amostras foliares de bananeiras, com ou sem sintomas de infecção viral (Tabela 1). De todas as amostras analisadas foi possível extrair o DNA total a partir das folhas de bananeira, sendo estes visualizados em gel de agarose 1% (p/v), corado com brometo de etídio. Este DNA foi utilizado para as reações de PCR.

Das 95 amostras coletadas, 59 foram positivas no teste de PCR (Tabela 1). Entretanto, apenas 35 apresentavam sintomas foliares de infecção pelo BSV na época da coleta (Tabela 1). Os dados apresentados demonstraram que a ausência de sintomas não se correlaciona, por vezes, com os resultados obtidos na reação de PCR. Isto pode ser explicado devido a esporadicidade dos sintomas causados pelo BSV, sendo algumas vezes mais pronunciados durante a estação fria do ano (4). Além disso, os sintomas causados pelo CMV são muito semelhantes àqueles causados pelo BSV (9).

As amostras positivas provenientes do Acre, do Amazonas, da Bahia, do Ceará, ('Prata Anã' e 'Maçã'), de Goiás, do Piauí, do Rio de Janeiro de Rondônia e de São Paulo que foram amplificadas utilizando os "primers" degenerados (BADNA 2 e MYS 3'), mostraram um padrão de amplificação contendo fragmentos de aproximadamente 750 pb (Figura 1A). O mesmo padrão foi obtido a partir do controle positivo (Figura 1A). Entretanto, três amostras tetraplóides, oriundas do Ceará e uma triploide do Amazonas (Tabela 1) apresentaram produtos amplificados com padrões distintos daqueles observados nas demais amostras (Figura 1B).

A partir do perfil eletroforético dos produtos amplificados observou-se a presença de, pelo menos, quatro padrões de seqüências amplificadas para o BSV no território nacional, e desta forma correspondentes a quatro estirpes do vírus. Estas estirpes foram denominadas de BSV-BR1, de BSV-BR2, de BSV-BR3 e de BSV-BR4 (Figura 1B).

A estirpe BSV-BR1 foi encontrada nas amostras do Acre, Amazonas, Bahia, Ceará ('Prata Anã' e 'Maçã'), Goiás, Minas Gerais, Piauí, Rio de Janeiro, Rondônia e São Paulo. A BSV-BR2 foi detectada em amostras provenientes do Amazonas ('Prata Zulu') e Ceará ('Pacovan Apodi'). Já BSV-BR3 e BSV-BR4 foram encontradas somente nas amostras provenientes do Ceará, nas cultivares FHIA-21 e PV-03-44, respectivamente.

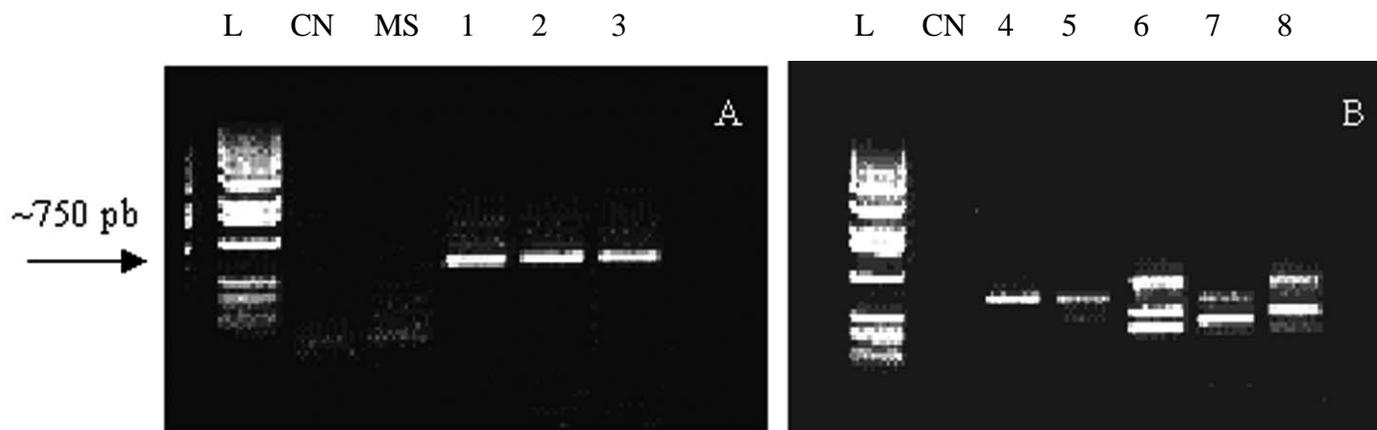
**Tabela 1.** Presença do *Banana streak virus* (BSV) confirmada por PCR, em diferentes cultivares de bananeiras, provenientes de diferentes localidades do Brasil.

Estado	n° de amostras	Grupo Genômico	Cultivar	PCR*	Sintomas*
Acre	01	AAAB	FHIA-21	+	+
	02	AAA	Caipira	+	+
	03	AAA	Caipira	-	-
Amazonas	01	AAB	Thap Maeo	+	+
	01		Prata Zulu	+	+
	03	AAB	FHIA-21	+	+
	02	AAAB	PV-53	+	+
	02	AAB	PV-85	+	+
	01	AAB	PV-142	-	-
	01	AAB	PV-4285	-	-
			AAAB		
	01	AA	Khai Nai On	+	+
	01	AA	Madu	-	-
Bahia	08	AAA	Caipira	+	05 + / 03 -
	01	AAA	Caipira	-	-
	01	AAA	Dois Cachos	-	-
	03	AAB	Mysore	+	+
	01	AAB	Mysore	-	-
	02	AAB	Thap Maeo	+	01 + / 01 -
	01	AAB	Thap Maeo	-	-
	01	AAB	Figue Pome Naine	-	-
	01	AABB	FHIA 03	-	-
Ceará	01	AAA	Grand Naine	-	-
	01	AAB	Maçã	-	-
	01	AAB	Maçã	+	-
	05	AAB	Mysore	-	-
	05	AAB	Pacovan	-	-
	01	AAAB	Pacovan Apodi	+	+
	01	AAB	Prata Anã	+	+
	01	AAB	Prata Anã	-	-
	01	AAAB	FHIA-21	+	-
	01	AAAB	FHIA-21	-	-
01	AAAB	Pioneira	-	-	
01	AAAB	PV-03-44	+	-	

Estado	nº de amostras	Grupo Genômico	Cultivar	PCR*	Sintomas*
Goiás	01	AAA	Caipira	+	-
	01	AAA	Grand Naine	+	-
	01	AAA	Nanicão	+	-
	01	AAB	Marmelo	+	-
	01	AAB	Prata Anã	+	-
	01	AAB	Terrinha	+	-
	01	AAAB	FHIA-21	+	-
	01	AAAB	FHIA-18	+	-
	01	AAAB	Pioneira	+	-
Minas Gerais	01	AAB	Mysore	+	+
	01	AAB	Prata Anã	-	-
Piauí	05	AAB	Pacovan	+	+
Rio de Janeiro	02	AAB	Mysore	+	-
	01	AAB	Mysore	-	-
	02	AAB	Prata	-	-
	01	AAB	Prata	+	-
	03	AAB	Prata Anã	+	+
Rondônia	01	ABB	Prata Zulu	+	-
Santa Catarina	02	AAA	Nanica	+	01 + / 01 -
	02	AAA	Nanica	-	-
	01	AAB	Maçã	+	-
	01	AAB	Pacovan	+	-
	01	AAB	Prata Anã	+	-
	01	AAAB	Catarina	-	-
	01	AAAB	FHIA-18	-	-
	01	AAAB	SH 3640	-	-
São Paulo	01	AAB	Mysore **	+	+

\* Amostras seguidas de + indicam presença confirmada do BSV por PCR e presença de sintomas, enquanto seguidas de – negativa para o BSV e ausência de sintomas.

\*\* Amostra utilizada como controle positivo



**Figura 1.** Eletroforese em gel de agarose a 1% corado com brometo de etídio de fragmentos do genoma do *Banana streak virus* (BSV) amplificados com “primers” degenerados, a partir de amostras foliares de bananeira: A. ‘Mysore’ - São Paulo (1); ‘Mysore’ - Bahia (2 e 3). B. ‘Mysore’ - São Paulo (4); Prata Anã - Ceará (5); ‘PV-03-44’ - Ceará (6); ‘Pacovan Apodi’ - Ceará (7); ‘FHIA-21’ - Ceará (8); (L) Marcador de massa molecular 1 kb DNA “Ladder” (Life Technologies do Brasil Ltda); Controle negativo sem DNA (CN); Bananeira ‘Mysore’ sadia (MS).

A análise destes resultados demonstra que os padrões eletroforéticos do BSV nas amostras da Bahia são similares aqueles do Acre, Goiás, Minas Gerais, Piauí, Santa Catarina, São Paulo, Rio de Janeiro e Rondônia, o que reforça a idéia de que as cultivares de bananeiras infectadas com o BSV nesses estados têm, possivelmente, a mesma origem. Contudo, pode-se inferir que os estados do Amazonas e do Ceará tenham recebido cultivares de bananeiras de outras localidades.

Relatos recentes vêm demonstrando que, quando alguma *Musa* spp. (bananeiras ou plátanos) é propagada por cultura de tecido, as plantas resultantes podem desenvolver infecções com o BSV (7, 12). O seqüenciamento e clonagem do DNA genômico da cultivar de plátano Obino I’Ewai revelou uma interface entre as seqüências do BSV e *Musa*, e um complexo BSV integrante denominado EPRV (“Endogenous pararetrovirus sequences”) (7). A comparação entre o DNA do vírion presente em infecções naturais e o DNA “episomal” de infecções associadas à cultura de tecidos de diferentes *Musa* spp. revelou que ambos foram altamente similares, se não idênticos (12). Relatos adicionais demonstram que as seqüências capazes de originar infecção episomal estão integradas somente no genoma B e que seqüências integradas no genoma A aparentemente não se expressam (5).

Estes trabalhos sugerem que todas as bananeiras híbridas, portadoras do genoma B, estariam potencialmente infectadas com o BSV, e que a única maneira de diagnosticar a presença do BSV em infecção episomal, ou seja, detectar a presença de vírions que poderiam ocasionar sintomas, seria através de PCR de imunocaptura. Entretanto, tais trabalhos não levam em consideração a grande variação antigênica existente entre os isolados do BSV. A mesma variação que levou os pesquisadores Lockhart & Olszewski (9) a afirmarem que técnicas sorológicas seriam ineficientes no diagnóstico do BSV podendo revelar resultados falsos negativos. Além do mais, estes trabalhos não se baseiam em grandes amostragens de diferentes localidades, para realmente poderem afirmar que todas as bananeiras portadoras do genoma B apresentam EPRVs.

Em nossos resultados encontramos 36 amostras de diferentes localidades que apresentaram resultado PCR negativo, sen-

do um considerável número destas bananeiras híbridas, triploídes e tetraploídes (Tabela 1). Este resultado sugere que a integração das EPRVs no genoma de *Musa*, provavelmente, não se deu em momentos iniciais da história evolutiva da planta e que há possibilidade de que matrizes livres de BSV ainda sejam encontradas.

Neste trabalho, o DNA utilizado foi extraído diretamente das folhas das bananeiras, dispensando etapas de purificação ou semi-purificação viral. Tal procedimento garante um diagnóstico mais preciso de seqüências do BSV, pois deste modo seqüências integradas no genoma de *Musa* e procedentes de infecção “episomal” ou natural, poderão ser detectadas. Porém, apresenta a desvantagem de não se poder distinguir entre o que é originário do vírion ou de seqüências integradas. Os “primers” utilizados para a reação são degenerados, ou seja, desenhados a partir de seqüências consenso conservadas para o gênero *Badnavirus*, o que sobrepõe os problemas associados a variabilidade genômica encontrada entre os isolados do BSV(1).

No Brasil, até então, o BSV só havia sido detectado em bananeiras do grupo genômico AAB (‘Mysore’ e ‘Pacovan’) (2, 3). Nos resultados obtidos detectou-se, molecularmente, seqüências do BSV pela primeira vez no país nos grupos genômicos AA, AAA, ABB e AAAB (Tabela 1). Isto demonstra que o vírus e/ou seqüências do BSV podem estar amplamente distribuídos no território nacional devido ao modo de propagação da bananeira. No entanto, a ausência do vírus em diferentes amostras, indica que existe a possibilidade de se obter mudas livres de vírus desde que se intensifique um programa de certificação de mudas de bananeira.

Assim, a metodologia empregada neste trabalho se mostra uma poderosa ferramenta, que poderá ser utilizada para garantir o movimento seguro de germoplasma e diagnosticar a presença em potencial do BSV em bananeiras oriundas de campo ou de cultura de tecidos. Esta medida poderia contribuir para o aumento do plantio de mudas sadias e, conseqüentemente, para o aumento da produção, atendendo tanto ao mercado interno quanto ao externo.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ahlawat, Y.S.; Pant, R.P.; Lockhart, B.E.L.; Srivastava, M.; Chakraborty, N.K.; Varma, A. Association of a *Badnavirus* with citrus mosaic disease in India. **Plant Disease**, Saint Paul, v.80, n.5, p.590-592, 1996.
2. Brioso, P.S.T.; Cordeiro, Z.J.M.; Rezende, J.A.M.; Kitajima, E.W.; Pimentel J.P.; Figueiredo, A.R. Infecção mista em bananeiras pelos vírus do mosaico do pepino ("*Cucumber mosaic virus*" – CMV) e da risca da bananeira ("*Banana streak virus*" – BSV) no Brasil. **Summa Phytopathologica**, Jaboticabal, v.26, n.2, p.254-257, 2000.
3. Brioso, P.S.T. Detecção e controle dos vírus das estrias e do mosaico da bananeira. In: V Simpósio brasileiro sobre bananicultura, 2003, Paracatu. **Anais**. Cruz das Almas: Nova Civilização, 2003. p.94-100.
4. Dahal, G.; Pasberg-Gauhl, C.; Gauhl, F.; Thottappilly, G.; D' Hughes, J. Studies on a Nigerian isolate of *Banana streak badnavirus*: II. Effect of intraplant variation on virus accumulation and reliability of diagnosis by ELISA. **Annals of Applied Biology**, London, v.132, n.2, p.263-275, 1998.
5. Geering, A.D.W.; 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**, Bristol, v.2, n.4, p.207-213, 2001.
6. Harper, G.; Hull, R. Cloning and sequence analysis of *Banana streak virus* DNA. **Virus Genes**, Norwell, v.17, n.3, p.271-278, 1998.
7. Harper, G.; Osuji, J.O.; Heslop-Harrison, P.; Hull, R. Integration of *Banana streak badnavirus* into the *Musa* genome: molecular and cytogenetic evidence. **Virology**, San Diego, v.255, n.2, p.207-213, 1999.
8. Harper, G.; Hart, D.; Moul, S.; Hull, R. Detection of *Banana streak virus* in field samples of bananas from Uganda. **Annals of Applied Biology**, London, v.141, n.3, p.247-257, 2002.
9. Lockhart, B.E.L.; Olszewski, N.E. Serological and genomic heterogeneity of *Banana streak badnavirus*: implications for virus detection in *Musa* germplasm. In: International Symposium on Genetic Improvement of Bananas for Resistance to Diseases and Pests, 1993, Montpellier. **Proceedings**. Montpellier: Dirad-Filhor & Inibap, 1993. p.105-113.
10. Meissner Filho, P.E.; Brioso P.S.T. **Frutas do Brasil: banana fitossanidade: doenças causadas por vírus**. Brasília: EMBRAPA, 2000. p.78-81.
11. Moreira, R.S. **Banana teoria e prática de cultivo**. 2. ed. Campinas: Fundação Cargill, 1999. 1 CD-ROM.
12. Ndowora, T.; Dahal, G.; Lafleur, D.; Harper, G.; Hull, R.; Olszewski, N.E.; Lockhart, B. Evidence that *Badnavirus* infection *Musa* can originate from integrated pararetroviral sequences. **Virology**, San Diego, v.255, n.2, p.214-220, 1999.
13. Sambrook, J.; Fritsch, E.F.; Maniatis, T. **Molecular cloning: A laboratory manual**. 2<sup>nd</sup> ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
14. Van Regenmortel, M.H.V.; Fauquet, C.M.; Bishop, D.H.L.; Carstens, E.B.; Estes, M.K.; Lemon, S.M.; Maniloff, J.; Mayo, M.A.; McGeoch D.J.; Pringle, C.R.; Wickner, R.B. **Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses: Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses**. San Diego: Academic Press, 2000. p.1167.