

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM PROTEÇÃO DE PLANTAS**

Janúbia Maria da Silva Santos

**INCIDÊNCIA E CARACTERIZAÇÃO DE BADNAVÍRUS NO BANCO DE
GERMOPLASMA DE CANA-DE-AÇÚCAR (*Saccharum* spp.) NA SERRA DO OURO,
MURICI-AL.**

Rio Largo, AL
Fevereiro de 2013

JANÚBIA MARIA DA SILVA SANTOS

INCIDÊNCIA E CARACTERIZAÇÃO DE BADNAVÍRUS NO BANCO DE GERMOPLASMA DE CANA-DE-AÇÚCAR (*Saccharum spp.*) NA SERRA DO OURO, MURICI-AL.

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós Graduação em Proteção de Plantas da Universidade Federal de Alagas, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Proteção de Plantas.

Orientador: Prof. Dr. Gaus Silvestre de Andrade Lima

Rio Largo, AL
Fevereiro de 2013

Folha de Aprovação

JANÚBIA MARIA DA SILVA SANTOS

INCIDÊNCIA E CARACTERIZAÇÃO DE BADNAVÍRUS NO BANCO DE GERMOPLASMA DE CANA-DE-AÇÚCAR DA ESTAÇÃO DE FLORAÇÃO E CRUZAMENTOS DA SERRA DO OURO.

Dissertação submetida ao corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Proteção de Plantas da Universidade Federal de Alagoas e aprovada em 23 de agosto de 2013.

Prof. Dr. Gaus Silvestre de Andrade Lima
Orientador, Universidade Federal de Alagoas

Banca Examinadora

Prof. Dr. Gaus Silvestre de Andrade Lima
Universidade Federal de Alagoas

Profa. Dra. Iraildes Pereira Assunção
Universidade Federal de Alagoas

Profa. Dra. Joyce Silva Lima
Universidade Federal de Alagoas – PNPd/CAPES

A Deus,

AGRADEÇO.

Aos meus filhos Bruno Vinícius Rocha S. Silva e Maria Victoria Ebrahim da Silva, ao meu esposo e companheiro de todas as horas, João Ebrahim Melquiades, pela confiança e incentivo, assim como aos meus irmãos Janúcia Maria Santos da S. Cabral e Jaedson Santos da Silva e em especial aos meus amados pais, Antonia Maria da Silva e Genivaldo dos Santos, que me deram a vida e me ensinaram a vivê-la com dignidade, sempre iluminando os caminhos obscuros com afeto e dedicação para que eu os trilhasse sem medo e pudesse realizar os meus sonhos, mesmo que muitas vezes tivessem de renunciar os seus.

DEDICO.

Desafiar a nossa própria capacidade é alimentar o nosso desejo de sempre ser um vencedor, a glória da vitória não é o contentamento de erguer um troféu de vencedor, mas o reconhecimento de uma luta constante por um ideal, pois nenhum obstáculo é intransponível quando a necessidade de vencer supera as impossibilidades.

Janúbia Maria da S. Santos.

AGRADECIMENTOS

A Deus, que nos momentos mais difíceis me deu forças para que eu continuasse a trilhar este caminho. Eu não teria chegado aonde cheguei se não fosse com a ajuda de Deus, pois eu sei que ele guia cada passo meu.

Ao meu orientador Prof. Dr. Gaus Silvestre de Andrade Lima, pelo incentivo, estímulo, paciência e amizade ao longo de toda minha carreira acadêmica e pessoal, meus sinceros e eternos agradecimentos.

À Profa. Dr^a. Joyce Silva Lima pela co-orientação, incentivo, atenção, disponibilidade e paciência de passar seus conhecimentos na execução do projeto com técnicas de laboratório, palavras não são suficientes para expressar sua contribuição na minha vida acadêmica e pessoal, muito grata por ter encontrado uma pessoa iluminada como você Dr^a Joyce Silva Lima.

À Prof^a. Dr^a. Iraildes Pereira Assunção, pela amizade, paciência, estímulo e competência com que me acompanhou durante toda a realização deste trabalho em cana-de-açúcar.

Às doutorandas Liliane Dias, Edilene Moraes, Jaqueline Figueredo, Sarah pela colaboração no desenvolvimento do projeto no laboratório e os graduandos do Curso de Agronomia, Mayra e Lucas pela colaboração em campo e em laboratório.

A todos os amigos e colegas do Centro de Ciências Agrárias da UFAL pela convivência durante todo esse tempo e principalmente as minhas amigas Erika Sales, Ellen Valente, Hully Monaise, Maria Quitéria e Vanessa Melo pelas palavras de incentivos nas diversas vezes que pensei em desistir.

A todos os professores que pude compartilhar as disciplinas durante o curso, muito obrigada por terem proporcionado conhecimentos valiosos e pela confiança que em mim depositaram.

Ao meu esposo João Ebrahim Melquiades, que solicitou férias no trabalho para está arduamente comigo na Universidade e nas madrugadas de pesquisas e compilação de dados. Pelos seus conselhos que me impulsionaram a continuar a caminhada, pela companhia nos momentos ímpares e singulares do dia-a-dia e pelo verdadeiro amor dedicado a mim.

Ao meu grande amigo João Ribeiro, que com seu jeito brincalhão mais uma pessoa muito competente, dedicada e inteligente, sempre tinha as palavras certas para reavivar o animo de sempre prosseguir, sou muito grata pela sua amizade.

Enfim, a todas as pessoas que de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho. Que Deus dê em dobro tudo aquilo que de bom desejam ao próximo e que continuem sendo estas pessoas especiais e iluminadas, mim emociono de tanta gratidão que tenho por cada um de vocês.

RESUMO

O cultivo da cana-de-açúcar constitui uma das principais atividades socioeconômicas do Brasil, que detém a maior área plantada e as maiores produções de açúcar e álcool do mundo. O principal banco de germoplasma da cana-de-açúcar do mundo está localizado na Estação de Floração e Cruzamentos da Serra do Ouro, em de Murici-AL que conta com mais de 2600 genótipos e tem sido o ponto de partida para o desenvolvimento de dezenas de variedades que recebem a sigla RB (República do Brasil). O cultivo de variedades RB ocupa quase 60% da área cultivada com cana-de-açúcar no país. Alguns desses materiais foram introduzidos durante a década de 1970 quando ainda não se dispunha de ferramentas apropriadas para a detecção de diversos fitopatógenos, especialmente os vírus. Dessa forma é provável que muitos vírus estejam disseminados na Estação de Floração e Cruzamentos da Serra do Ouro. Alguns desses vírus podem se tornar uma ameaça para a manutenção dos genótipos. Portanto, é importante que o material genético desse banco seja testado para a presença de fitovírus utilizando-se metodologias modernas e sensíveis. Diante do exposto o objetivo do presente trabalho foi verificar a incidência e caracterizar os *Badnavirus* que ocorrem no banco de germoplasma da Serra do Ouro. A técnica de PCR foi empregada para avaliar 200 genótipos incluindo aqueles mais frequentemente utilizados nos cruzamentos. Os resultados indicaram que 36,5% dos genótipos avaliados estavam infectados. Trinta e dois produtos de PCR foram completamente sequenciados e as sequencias obtidas utilizadas para reconstrução filogenética por meio de máxima verossimilhança, incluindo sequencias de diversos *Badnavirus* depositadas no Genbank. A árvore obtida sugere que cinco espécies distintas estão ocorrendo no banco de germoplasma, sendo duas espécies já descritas *Banana streak virus* e *Sugarcane bacilliform MO virus* e três possíveis novas espécies. A alta incidência e diversidade de *Badnavirus* observada nesse estudo podem levar a perda de importantes materiais genéticos, dificultando o intercâmbio dos mesmos e apontam para a necessidade de substituir os materiais infectados e de adotar medidas que dificultem a infecção de outros genótipos.

Palavras-chaves: *Saccharum* spp., *Banana streak virus* e *Sugarcane bacilliform MO virus*

ABSTRACT

The sugarcane cultivation constitutes one of most important socio-economic activities in Brazil, which provide the largest cropped area and the largest production of sugar and ethanol of the world. The main sugarcane germplasm bank of the world is located at “Serra do Ouro”, in the municipality of Murici, Alagoas state, Brazil, with over 2,600 genotypes and has been the starting point for the development of dozens of varieties named RB (Republic of Brazil). The cultivation of RB varieties occupies almost 60% of the sugarcane cropping area in the country. Some of these genetic materials were introduced in the late 1970s when it had not yet suitable methods for the detection of various plant pathogens, specially the viruses. Thus, it is probably that many of these viruses were spread in the germplasm bank of “Serra do Ouro”. Some of these pathogens can become a threat for the genotypes maintaining. Thus, it is important to test the genetic material of this bank to detect the presence of viruses using current and reliable methodologies. In view of this, the aim of this study was to evaluate the disease incidence and to characterize the *Badnavirus* that occur in the germplasm bank of “Serra do Ouro”. The PCR technique was performed in order to evaluate 200 genotypes, including those most frequently used in the crosses. The results indicated that 36.5% of the tested genotypes were infected. Thirty-two PCR products were completely sequenced and these sequences were used for phylogenetic reconstruction by maximum likelihood, including sequences of many *Badnavirus* deposited in Genbank. The phylogenetic tree indicates that five distinct virus species are occurring in the germplasm bank, and of these, two species already described, *Banana streak virus* and *Sugarcane bacilliform MO virus* and three possible new species. The high disease incidence and *Badnavirus* diversity observed in this study may lead to loss of important genetic materials, hindering its exchange and indicate a need of replace the infected materials, and to adopt measures of control to hinder the infection of other sugarcane genotypes.

Palavras-chaves: *Saccharum* spp., *Banana streak virus* e *Sugarcane bacilliform MO virus*

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1-** Plantas de cana-de-açúcar apresentando clorose (A e B) e estrias cloróticas (C), sugestivos de infecção viral..... 28
- Figura 2-** Amplicons obtidos a partir do DNA total extraído de plantas de cana-de-açúcar na presença dos primers BADNAFF e BADNAFP..... 32
- Figura 3-** Árvore de máxima verossimilhança baseada nas seqüências de um fragmento de 579 pares de bases correspondente à região RT/RNase H do genoma de badnavírus..... 35
- Figura 4-** Porcentagem de identidade nucleotídica entre os isolados sequenciados e os badnavírus mais relacionados..... 36

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição do banco de germoplasma da Serra do Ouro - RIDESA, localizada no município de Murici, AL.	17
Tabela 2 -Número de espécies e espécies-tipo reconhecidas pelo ICTV (<i>International Committee on Taxonomy of Viruses</i>) dos diferentes gêneros pertencentes à família <i>Caulimoviridae</i>	20
Tabela 3 -Espécies de <i>Badnavirus</i> reconhecidas pelo ICTV (<i>International Committee on Taxonomy of Viruses</i>).....	23
Tabela 4 . Sequências depositadas no Genbank e utilizadas na construção da árvore filogenética nas comparações par-a-par.....	30
Tabela 5 . Genótipos provenientes do Banco de Germoplasma de cana-de-açúcar da Serra do Ouro testados para a presença de Badnavirus pela técnica de PCR.....	47

LISTA DE SIGLAS

CECA - Centro de Ciências Agrárias

CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento

IAA - Instituto do Açúcar e do Alcool

IFES - Universidades Federais de Ensino Superior

ICTV - Comitê Internacional de Taxonomia Viral

NCBI – *National Center of Biotechnology Information*

PCR - Reação em cadeia da polimerase

PLANALSUCAR - Programa Nacional de Melhoramento da Cana-de-açúcar

PMGCA - Programa de Melhoramento Genético da Cana-de-açúcar

RIDESIA - Rede Interuniversitária para o Desenvolvimento do Setor Sucroalcooleiro

RB – República Federativa do Brasil

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	15
2.1. A cana-de-açúcar: classificação botânica, origem e importância econômica	15
2.2. Melhoramento Genético da Cana-de-açúcar	16
2.3 Doenças da Cana-de-açúcar.....	19
2.4. Família Caulimoviridae	20
2.5. Gênero Badnavirus	22
2.6. Badnavirus na Cultura da Cana-de-açúcar	27
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	28
3.1. Coleta de Amostras.....	28
3.2 Análise da Incidência de Badnavirus.....	28
3.3 Caracterização dos Badnavirus.....	29
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
4.1 Incidências de Badnavirus no banco de germoplasma da cana-de-açúcar da Serra do Ouro	31
4.2. Caracterização dos Badnavirus de ocorrência no Banco de Germoplasma da Estação de Floração e Cruzamentos da Serra do Ouro.....	32
5. CONCLUSÃO.....	37
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	38
7. ANEXO.....	47

1. INTRODUÇÃO

O cultivo da cana-de-açúcar é uma importante atividade econômica do Brasil, que detém a maior área plantada e as maiores produções de açúcar e álcool do mundo (AGRINUAL, 2005). A expansão da área cultivada e os altos índices produtivos são consequências de diversos fatores, sobretudo do emprego de tecnologias de última geração e do desenvolvimento de variedades mais produtivas, mais adaptadas e mais resistentes a fatores bióticos e abióticos.

Por outro lado os programas de melhoramento genético da cultura dependem da variabilidade genética encontrada nos bancos de germoplasma. Um dos principais bancos de germoplasma da cana-de-açúcar do mundo está localizado na Estação de Floração e Cruzamentos da Serra do Ouro, localizado no município de Murici-AL e vinculado à Universidade Federal de Alagoas. Esse banco conta com mais de 2600 genótipos e tem sido o ponto de partida para o desenvolvimento de dezenas de variedades que recebem a sigla RB (República do Brasil) e que atualmente ocupam quase 60% da área cultivada com cana-de-açúcar no país (RIDESA, 2010).

O material genético que compõe o banco inclui muitas variedades e genótipos desenvolvidos no próprio banco e materiais provenientes de outros programas de melhoramento do Brasil e de diversos países. Alguns desses materiais foram introduzidos durante a década de 1970 quando ainda não se dispunha de ferramentas apropriadas para a detecção de diversos fitopatógenos, especialmente os vírus.

Dessa forma é provável que muitos vírus, especialmente aqueles que causam infecções latentes ou sintomas que podem ser confundidos com distúrbios nutricionais como clorose, estrias e amarelecimento, entre outros, estejam disseminados na Estação de Floração e Cruzamentos da Serra do Ouro. Possivelmente alguns desses vírus podem se tornar uma ameaça para a manutenção dos genótipos. Esse parece ser o caso dos *Badnavirus*, um gênero com genoma de DNA de fita dupla que reúne 25 espécies, sendo pelo menos duas relatadas como patogênicas à cana-de-açúcar (KING et al., 2012).

O *Sugarcane bacilliform IM virus* foi o primeiro *Badnavirus* descrito sobre *S. officinarum* apresentando estrias cloróticas ou em infecção latentes em Cuba (RODRIGUEZ LEMA et al., 1985; LOCKHART & AUTREY, 1988). Essa espécie também já foi relatada na Austrália, nos Estados Unidos e no Marrocos e tem como vetor a cochonilha *Saccharicoccus sacchari* Cockerell (JONES & LOCKHART, 1993). Além de *Saccharum* spp., o vírus infecta plantas de bananeira em condições experimentais (LOCKHART, 1995).

O outro *Badnavirus* que infecta a cana-de-açúcar é *Sugarcane bacilliform MO virus*, relatado nos Estados Unidos sobre *S. officinarum* (BOUHIDA et al., 1993) apresentando estrias cloróticas. Ainda não se conhece o vetor desse vírus em condições naturais sendo transmitido apenas por propagação vegetativa, mas em condições experimentais o vírus pode infectar *M. acuminata* (BOUHIDA et al., 1993).

No Brasil existe apenas um relato de *Badnavirus* em cana-de-açúcar (SORDI & VEGA, 1991). Esse registro se baseou unicamente em microscopia eletrônica e assim a identidade da espécie não pode ser feita. Contudo, há registros bem documentados desses vírus no país sobre plantas de bananeira e bougainvillea (CHAGAS et al., 2001).

Considerando a importância do banco de germoplasma da cana-de-açúcar da Estação de Floração e Cruzamentos da Serra do Ouro e ausência de estudos a respeito de fitovirose, o objetivo do trabalho foi verificar a incidência e caracterizar os *Badnavirus* que podem ocorrer no referido banco de germoplasma.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. A cana-de-açúcar: classificação botânica, origem e importância econômica

A cana-de-açúcar é uma espécie vegetal de grande importância para a agricultura brasileira e mundial. Segundo Daniels e Roach (1987), trata-se de uma espécie alógama, da família Poaceae tribo Andropogoneae, gênero *Saccharum*. Dentro do gênero *Saccharum*, ocorrem seis espécies: *S. officinarum* L. ($2n = 80$), *S. robustum* Brandes e Jeswiet ex Grassl ($2n = 60-205$), *S. barberi* Jeswiet ($2n = 81-124$), *S. sinense* Roxb. ($2n = 111-120$), *S. spontaneum* L. ($2n = 40-128$), e *S. edule* Hassk. ($2n = 60-80$). Como o genoma dessas espécies podem estar participando de alguma forma das cultivares modernas, considera-se que a cana-de-açúcar seja uma espécie de grande complexidade genética ou híbridos interespecíficos do gênero *Saccharum*. Apesar do tempo decorrido desde a descrição deste gênero, sua composição, ainda é questionada, devido à grande dificuldade na determinação de suas espécies, causada pela intensa hibridação e a geração de muitas formas intermediárias com números cromossômicos diferentes, aos polimorfismos entre euplóides e aneuplóides e às pressões de seleção da natureza e do homem (AMALRAJ & BALASUNDARAM, 2006).

A cana-de-açúcar é uma das culturas mais importantes no cenário socioeconômico brasileiro, por ser a principal fonte de matéria-prima utilizada pela indústria sucroalcooleira para a produção de açúcar e álcool. O Brasil não é apenas o maior produtor de cana, é também o primeiro do mundo na produção de açúcar e etanol, conquistando cada vez mais, o mercado externo com o uso do biocombustível como alternativa energética (VASCONCELOS, 2002).

As áreas em produção continuam com progressivo aumento, sendo que esse crescimento representa a consolidação das novas variedades disponíveis no mercado, aliado ao crescimento das áreas plantadas com variedades mais antigas (CONAB, 2012).

A área cultivada com cana-de-açúcar que será colhida e destinada à atividade sucroalcooleira na safra 2012/13 está estimada em 8.520,5 mil hectares, distribuídas em vários estados produtores conforme suas características. São Paulo é o maior produtor com 51,87% (4.419,46 mil hectares), seguido por Goiás com 8,52% (725,91 mil hectares), Minas Gerais com 8,47% (721,86 mil hectares), Paraná com 7,17% (610,83 mil hectares), Mato Grosso do Sul com 6,37% (542,70 mil hectares), Alagoas com 5,23% (445,71 mil hectares) e Pernambuco com 3,84% (327,61 mil hectares). Nos demais estados produtores as áreas são menores, com

representações abaixo de 3% (CONAB, 2012). A produtividade média brasileira está estimada em 69.846 kg/ha, 4,2% maior que na safra 2011/12, que foi de 67.060 kg/ha (CONAB, 2012).

A cadeia produtiva da cana-de-açúcar, assim como os seus produtos e subprodutos, principalmente o açúcar e o álcool, contribuem para a distribuição de riqueza, além de ser fonte de energia líquida e renovável propiciando a redução da poluição ambiental (MATSUOKA et. al 2005).

No sistema produtivo canavieiro brasileiro, o cultivo de variedades com boas características agroindustriais é a melhor forma de se obter ganhos da produtividade com baixo custo. A atuação dos programas de melhoramento genético desta cultura contribuiu expressivamente para o desenvolvimento do setor sucroalcooleiro nacional, com a liberação de variedades mais produtivas e mais resistentes ao ataque de pragas e doenças (BARBOSA et al 2003).

Diante do exposto o objetivo do presente trabalho foi verificar a incidência e caracterizar os *Badnavirus* que ocorrem no banco de germoplasma da Serra do Ouro.

2.2. Melhoramento Genético da Cana-de-açúcar

O Programa de Melhoramento Genético da Cana-de-açúcar (PMGCA) da Rede Interuniversitária para o Desenvolvimento do Setor Sucroalcooleiro (RIDESA), composta por 10 universidades federais (Universidade Federal de Alagoas, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Universidade Federal de Sergipe, Universidade Federal de Viçosa, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Universidade Federal de São Carlos, Universidade Federal do Piauí, Universidade Federal do Paraná Universidade Federal do Mato Grosso e Universidade Federal de Goiás), as quais obtêm as variedades RB (República Federativa do Brasil). Em Alagoas, o PMGCA situa-se na Unidade Acadêmica Centro de Ciências Agrárias (CECA) da UFAL, em parceria com o setor produtivo canavieiro. As inovações tecnológicas desenvolvidas pelo PMGCA/CECA/UFAL e transferidas para o setor produtivo vêm contribuindo significativamente para a elevação da produtividade e da qualidade das unidades produtoras de açúcar, etanol e bioeletricidade (RIDESA 2010).

O PMGCA teve sua origem em 1971, quando foi estabelecido o PLANALSUCAR- Programa Nacional de Melhoramento da Cana-de-açúcar, que foi nomeado para atuar em áreas de pesquisas do antigo IAA- Instituto do Açúcar e do Álcool. O programa tinha como seu

principal objetivo o de renovação da lista de variedades de cana-de-açúcar existente, entre elas algumas importadas, as quais se consolidavam na produção sucroalcooleira do país, e que era representada por variedades antigas que já apresentavam evidências de deterioração e que não acompanhava a produção por serem variedades específicas de algumas regiões.

Na obtenção de variedades RB, a RIDESA tem como ponto de partida um banco de germoplasma da Estação de Floração e Cruzamento Serra do Ouro, situada em Murici - Alagoas a 09°13'S; 35°50'W; 515m de altitude. A área total da Estação é de 32 hectares e apresenta pluviosidade anual média de 2.363mm, temperaturas mínima e máxima com média de 18,2°C e 27,9°C, respectivamente, distando 34 km do litoral. Por sua localização e clima privilegiados, permite o florescimento natural e profuso da cana-de-açúcar, necessário para a realização de hibridações previamente planejadas pelos pesquisadores das Universidades que compõem a RIDESA.

Essa base de pesquisa teve sua origem em 1967, quando o Sindicato da Indústria do Açúcar no Estado de Alagoas implantou a primeira coleção de genótipos de cana, realizando as primeiras hibridações para as seleções das variedades RB. De 1971 até 1989 essas atividades passaram para o âmbito do IAA-PLANALSUCAR, que nesse período obteve e liberou para o setor produtivo nacional 19 variedades RB (BARBOSA et al., 2003). A partir de 1990, a Serra do Ouro passou para a RIDESA, com gestão da Unidade Acadêmica Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Alagoas.

Atualmente o banco de germoplasma da Serra do Ouro é composto de 2.607 genótipos, provenientes de programas nacionais e internacionais (Tabela 1).

Tabela 1. Composição do banco de germoplasma da Serra do Ouro - RIDESA, localizada no município de Murici, AL.

Espécies / Híbridos	Nº de Acessos
<i>Saccharum officinarum</i>	50
<i>Saccharum sinense</i>	7
<i>Saccharum robustum</i>	9
<i>Saccharum spontaneum</i>	3
<i>Saccharum barberi</i>	5

<i>Saccharum edule</i>	1
<i>Erianthus arundinaceus</i>	4
Híbridos	2.528
Total	2.607

Fonte: (RIDESA,2010)

A estratégia básica do PMGCA-RIDESA para obtenção de novas variedades RB baseia-se em cruzamentos de indivíduos superiores, que são realizados visando à seleção de genótipos que apresentem características vantajosas em produtividade agroindustrial e tolerância aos principais estresses - pragas, doenças, seca, geada, salinidade e florescimento (RIDESA, 2010).

Depois de completado todo o processo de fecundação inicia-se o período de maturação das sementes, coleta das cariopses, secagem, beneficiamento, armazenamento e posterior remessa para as Universidades Federais de Ensino Superior (IFES) que compõe a RIDESA, que a cada ano iniciam um novo ciclo de seleção e experimentação de variedades RB. (RIDESA, 2010) A adoção destas tecnologias para novas variedades é o que tem contribuído para o avanço sustentável do setor, pois ao considerar o avanço em produtividade que ocorreu com a cana-de-açúcar nos últimos 40 anos, verificou-se um aumento em mais de 30% na produtividade média como também a evolução significativa na qualidade da matéria-prima. Neste sentido, a liberação de novas variedades disponíveis no mercado aliado ao manejo adequado pode contribuir para elevação da produtividade com menores custos de produção. (RIDESA, 2003).

Mais importante do que o número de variedades liberadas é o nível de adoção das mesmas pelo setor produtivo. De acordo com o censo varietal 2009, realizado pela RIDESA considerando todas as IFES integrantes, as variedades RB ocupam 58% dos canaviais do País, chegando a algumas regiões a representar áreas superiores a 70%. Ao considerar os últimos censos realizados pela RIDESA verificou-se tendência crescente na área plantada com variedades RB impulsionadas principalmente pela liberação de novas variedades que tiveram plantio expressivo em todo território nacional. (RIDESA, 2003).

O PMGCA/CECA/UFAL, se preocupa não só com a criação, desenvolvimento e liberação de novas variedades de cana-de-açúcar para o mercado, mas também com a fitossanidade das mesmas, objetivando solidificar um avanço sustentável para o setor sucroalcooleiro.

2.3 Doenças da Cana-de-Açúcar

Entre as principais doenças em cana-de-açúcar podem ser citadas as causadas por bactérias como a escaldadura-das-folhas, que tem como agente causal *Xanthomonas albilineans*. A bactéria coloniza os vasos do xilema, agindo de forma sistêmica e podendo se disseminar principalmente por meio de ferramentas de corte (facão, colhedora), por mudas contaminadas, além do vento e das chuvas (KIMATI, H et al, 2005). Podem causar perdas de até 100%, com a queima das folhas e morte dos colmos. Também causada por bactérias, o raquitismo da soqueira apresenta-se como uma das principais doenças da cana-de-açúcar onde quase todas as variedades são suscetíveis. A doença é causada por *Leifsonia xylli*. Não existe um sintoma característico da doença, porém se observa o crescimento desordenado dos colmos, como o próprio nome da doença retrata, além de sintomas internos que é o desenvolvimento de uma coloração avermelhada nos feixes vasculares. Sua transmissão se dá, assim como a escaldadura, por ferramentas de corte e também via plantio de toletes contaminados (MATSUOKA, 1975).

Os fungos também são causadores de algumas doenças de grande importância para a cultura da cana. O carvão, causado *Ustilago scitaminea*, pertencente a classe dos Ustomycetes infecta a planta através dos teliosporos e colonizam preferencialmente os tecidos meristemáticos. O principal sintoma da doença é a formação de uma estrutura chamada de “chicote”, induzida pelo fungo, que pode chegar a até meio metro de comprimento. Sua disseminação ocorre através, principalmente, do vento. Outra doença de origem fúngica que merece destaque é a ferrugem marrom, causada pelo fungo *Puccinia melanocephala*. Geralmente apresentam coloração avermelhada ou marrom-alaranjada nas folhas, iniciando com pequenas manchas cloróticas que evoluem para manchas alongadas de cores amareladas e tamanhos variáveis (MATSUOKA et al., 2005). Sua principal forma de disseminação também se dá através do vento, que transporta os uredósporos por longas distâncias.

As principais doenças causadas por vírus na cana-de-açúcar são o mosaico e a síndrome do amarelecimento foliar, no entanto outros vírus menos estudados têm sido relatados causando doenças nessa cultura (BOUHIDA, 1993).

O mosaico da cana-de-açúcar ocorre em mais de 70 países, sendo o *Sugarcane mosaic virus* (SCMV) e o *Sorghum mosaic virus* (SrMV), pertencentes ao gênero *Potyvirus*, família *Potyviridae* os agentes etiológicos da doença (ALEGRIA et al., 2003).

Os sintomas caracterizam-se pelo mosaico nas folhas novas. Touceiras tem desenvolvimento retardado, podendo ter sua altura reduzida à metade. Os sintomas mais frequentes surgem em canaviais jovens e com bom crescimento vegetativo. Ocasionalmente em variedades extremamente suscetíveis, os colmos podem apresentar sintomas de riscas e estrias deprimidas que podem evoluir até a necrose do tecido sub-epidérmico. Neste caso o encurtamento dos entrenós são acentuados (BIANCHINI et al., 2005).

A síndrome do amarelecimento foliar (SAF), também conhecida por “amarelinho” foi relatada no Brasil em 1989, mas começou a se tornar problema sério a partir do início da década de 90 (VEGA; SCAGLIUSI; ULIAN, 1997). Plantações comerciais feitas com a variedade SP71-6163, no Estado de São Paulo, mostraram perdas de produção de até 50%. Nesta época, as investigações sobre a causa da doença, conduzidas no Brasil e no exterior, levantaram várias hipóteses, entre as quais fatores relacionados ao solo e clima ou mesmo a agentes bióticos, como fungos, nematóides, vírus e fitoplasmas. No entanto estudos demonstraram que o *Sugarcane yellow leaf curl virus*, agente causal do amarelinho, pertencente ao gênero *Luteovirus* (SCAGLIUSI; LOCKHART, 2000).

Outros vírus vêm sendo relatados sobre a cana-de-açúcar, mas em muitos casos a importância econômica dessas viroses ainda carece ser determinada. Esse é o caso dos *Badnavirus* (Família Caulimoviridae), patógenos cujos relatos de ocorrência vêm aumentando na cultura da cana-de-açúcar em vários países.

2.4. Família *Caulimoviridae*

A Família *Caulimoviridae* engloba os vírus que se replicam através da transcrição reversa (King et al. 2012). De acordo com o Comitê Internacional de Taxonomia Viral (ICTV), essa Família é composta pelos gêneros *Badnavirus*, *Caulimovirus*, *Cavemovirus*, *Petuvirus*, *Solendovirus*, *Soymovirus*, *Tungrovirus*, cujos números de espécies reconhecidas pelo ICTV podem ser visualizados na Tabela 2.

Tabela 2. Número de espécies e espécies-tipo reconhecidas pelo ICTV (*International Committee on Taxonomy of Viruses*) dos diferentes gêneros pertencentes à família *Caulimoviridae*.

Gênero	Espécie tipo	Número de espécies reconhecidas
--------	--------------	---------------------------------

<i>Badnavirus</i>	<i>Commelina yellow mottle vírus</i>	25
<i>Caulimovirus</i>	<i>Cauliflower mosaic vírus</i>	9
<i>Cavemovirus</i>	<i>Cassava vein mosaic virus</i>	2
<i>Petuvirus</i>	<i>Petunia vein clearing virus</i>	2
<i>Solendovirus</i>	<i>Tobacco vein clearing virus</i>	2
<i>Soymovirus</i>	<i>Soybean chlorotic mottle virus</i>	4
<i>Tungrovirus</i>	<i>Rice tungro bacilliform virus</i>	1

Os vírus dessa família apresentam partículas não envelopadas com morfologia isométrica ou baciliforme. Suas dimensões variam de 35-50 nm de diâmetro por 900 nm de comprimento (para os baciliformes) ou 45-50 nm de diâmetro para os isométricos. O genoma dos caulimovírus é uma molécula de DNA semicircular de fita dupla com cerca de 6-8 kb (FAUQUET et al., 2005), possuindo geralmente uma região intergênica poli (A) e descontinuidades de fita simples ou gaps em sítios específicos de ambas as fitas (HARPER et al., 2002).

Os hospedeiros naturais dos caulimovírus incluem Angiospermas das classes Dicotyledonae e Monocotyledonae. Dependendo do gênero, a transmissão natural do vírus pode ocorrer via inseto-vetor, que são hemípteros das famílias Aleyrodidae, Aphididae, Cicadellidae e Pseudococcidae, por contato entre plantas, bem como por sementes ou pelo pólen. A transmissão pode ser também realizada por técnicas como a inoculação mecânica e enxertia (FAUQUET et al., 2005). Os sintomas característicos associados aos caulimovírus compreendem: clareamento de nervuras, estrias, mosaico, manchas necróticas, linhas e manchas cloróticas, nanismo, enrolamento da folha, má formação foliar e enrolamento de folíolos.

Os membros da família Caulimoviridae são classificados como "Pararetrovirus", termo introduzido por Temin (1985) para definir vírus de plantas que diferem dos retrovírus com base no seu genoma de DNA e na sua integração irregular dentro do genoma hospedeiro para a replicação. Sabe-se até então que as sequências genômicas de alguns pararetrovirus vegetais, como *Petunia vein clearing virus* (PVCV) (RICHERT-PÖGGELER; SHEPERD, 1997) e *Banana streak virus* (BSV) (NDOWORA et al., 1999; HARPER et al., 2005), são integradas no genoma hospedeiro, e que podem dar origem a vírus episomais (NDOWORA et al., 1999). Assume-se geralmente que as sequências integradas são provenientes de eventos de infecções antigas

(HARPER et al, 2005) ou sequências representativas intermediárias entre caulimovírus e retrotransposons LTR (BOUSALEM et al., 2008; LLORENS et al., 2009).

2.5. Gênero *Badnavirus*

O nome *Badnavirus* foi originado do termo “bacilliform DNA virus”, sendo *Commelina yellow mottle virus* (ComYMV) a espécie tipo deste gênero. Tal espécie foi detectada pela primeira vez em *Commelina diffusa* L., na Ilha de Guadalupe (Caribe), por Migliori & Lastra (1978). A partir desta citação inúmeras espécies têm sido assinaladas a nível mundial, tornando-se o gênero mais numeroso dentro da Família caulimoviridae e o segundo entre os fitovírus com genoma de DNA (FAUQUET et al., 2005).

No Brasil, a primeira alusão a respeito de um *Badnavirus* infectando cana-de-açúcar foi citada por Vega & Sordi, (1991). Entretanto os autores basearam a identificação exclusivamente em microscopia eletrônica, fato que não possibilitou a determinação da(s) espécie(s) envolvidas. Esse relato foi feito no Estado de São Paulo, associado à doença denominada estria clorótica e aparentemente é o único relato de *Badnavirus* em cana-de-açúcar no Brasil. Posteriormente vieram outros relatos de *badnavirus* infectando Iuca-elefante ou vela-de-pureza (*Yucca elephantipes* Hort. ex Regel.) (RIVAS et al., 1993). Com clorose em bananeira (*Musa* spp.) cv. Mysore com sintomas de estrias, Brioso et al. (1997). Em pimenta do reino (*Piper nigrum* L.) apresentando mosqueado amarelo, Albuquerque et al. (1999) e Duarte et al. (1999). Em *Bougainvillea spectabilis* Willd apresentando clorose, Chagas et al. (2001). Em plantas de *Schefflera* sp. com clorose anelar, (BRIOSO et al., 2003). Em *Bougainvillea glabra* com clorose Yamashita et al., (2004) e em *Dioscorea* sp. (inhame) também com clorose, Boari et al., (2005). A Tabela 3 traz um registro atual da ocorrência de *Badnaviru*.

No Brasil, (FIGUEIREDO et al., 2006) evidenciaram por PCR, com *primers* degenerados, a presença de pelo menos quatro possíveis espécies de *Badnavirus*, designadas: Banana streak UB virus - prevalece nos Estados do Acre, Amazonas, Bahia, Ceará, Goiás, Minas Gerais, Piauí, Rio de Janeiro, Rondônia, Santa Catarina, São Paulo; Banana streak Brazil 2 virus - encontrada no Estado do Amazonas e Ceará; Banana streak Brazil 3 virus - encontrada no Estado do Ceará; Banana streak PZ virus - encontrada no Estado do Amazonas. Bem como evidenciaram um número expressivo de bananeiras híbridas (oriundas de diferentes Estados brasileiros) - diplóides (AA), triplóides (AAA, AAB) e tetraplóides (AAAB, AABB) livres de *Badnavirus* que poderiam

ser utilizadas como matrizes para a cultura de tecidos visando à obtenção de mudas sadias, indexadas e certificadas para este gênero viral.

De acordo com King et al. (2012) os principais critérios usados para reconhecer uma espécie de *Badnavirus* são: diferenças na faixa de hospedeiro; identidade de nucleotídeos acima de 80% na região genômica que codifica a Polimerase (Reverse Transcriptase + Ribonuclease H); diferenças na sequência dos produtos gênicos e na especificidade do vetor.

As perdas para as culturas afetadas por estes vírus variam em função da espécie botânica, cultivar/ variedade e percentual de plantas infectadas, da idade e época de infecção na planta, da virulência da estirpe/espécie viral, do sinergismo com outros vírus. Dependendo da espécie de *Badnavirus* infectando um determinado hospedeiro pode ter baixa expressão econômica ou pode causar perdas severas, seja em qualidade ou em quantidade da produção, podendo, em casos extremos, ocasionar a morte da planta. (AHLAWAT et al., 1996; COMSTOCK & LOCKHART, 1996; BHAT et al., 2003; GEJSKES, 2003; BARANWAL et al., 2005; GEERING, 2009; BESSE et al., 2010).

Tabela 3. Espécies de *Badnavirus* reconhecidas pelo ICTV (*International Committee on Taxonomy of Viruses*).

Espécie de <i>Badnavirus</i>	Acrônimo	Ocorrência no Brasil
<i>Aglaonema bacilliform vírus</i>	ABV	Ausente
<i>Banana streak GF vírus</i>	BSGFV	? [#]
<i>Banana streak MY vírus</i>	BSMyV	Presente
<i>Banana streak OL vírus</i>	BSOLV	?
<i>Banana streak VN vírus</i>	BSVNV	?
<i>Bougainvillea chlorotic vein banding virus</i>	BCVBV	MG, RJ, SP
<i>Cacao swollen shoot vírus</i>	CSSV	Ausente
<i>Canna yellow mottle vírus</i>	CaYMV	Ausente
<i>Citrus yellow mosaic vírus</i>	CiYMV	Ausente
<i>Commelina yellow mottle vírus</i>	ComYMV	Ausente
<i>Dioscorea bacilliform AL vírus</i>	DBALV	Presente
<i>Dioscorea bacilliform SN vírus</i>	DBSNV	?

<i>Gooseberry vein banding associated virus</i>	GVBaV	Presente
<i>Grapevine vein clearing vírus</i>	GVCV	Ausente
<i>Kalanchoë top-spotting vírus</i>	KTSV	Ausente
<i>Pineapple bacilliform CO vírus</i>	PBCOV	?
<i>Pineapple bacilliform ER vírus</i>	PBERV	?
<i>Piper yellow mottle vírus</i>	PYMV	AM, MG, ES, PA, RJ
<i>Rubus yellow net vírus</i>	RYNV	Ausente
<i>Schefflera ringspot vírus</i>	SRV	MG, RJ, RN, RS, SP
<i>Spiraea yellow leaf spot virus</i>	SYLSV	Ausente
<i>Sugarcane bacilliform IM vírus</i>	SCBIMV	?
<i>Sugarcane bacilliform MO vírus</i>	SCBMoV	?
<i>Sweet potato pakakuy vírus</i>	SPPV	Ausente
<i>Taro bacilliform vírus</i>	TaBV	Ausente

*NCBI – *National Center of Biotechnology Information*

#Isolado de *Badnavirus* relacionado à possível espécie, no entanto, os dados parciais disponíveis são insuficientes para confirmar a presença ou ausência da mesma.

No Brasil, relatos de perdas ocasionadas por *Badnavirus* têm sido associadas à clorose do Inhame, ao mosqueado amarelo da pimenta do reino e a estria da bananeira, seja em infecção simples ou mista com outros vírus. Os principais sintomas associados com *Badnavirus* são clorose, estrias cloróticas e/ou necróticas, manchas (principalmente, em frutos), mosaico, mosqueado, nanismo, *vein banding*, clorose e/ou necrose de nervura. Nas épocas frias os sintomas foliares são mais pronunciados e tendem a se atenuar nos períodos mais quentes do ano. Vale ressaltar, que nem sempre os *Badnavirus* são detectados em plantas sintomáticas e podem também estar presente em plantas assintomáticas (GAUHL et al., 1997).

De um modo geral os *Badnavirus* possuem gama restrita de hospedeiros, delimitada a uma ou duas famílias botânicas, são transmitidos principalmente por insetos da família *Pseudococcidae* (*Hemiptera*) de maneira semi-persistente, sendo que todos os estádios móveis do vetor podem adquirir e transmitir o vírus (LOCKHART e OLSZEWSKI, 1994).

Alguns *Badnavirus* são transmitidos mecanicamente, porém com dificuldade, a partir do extrato tamponado da seiva. É o que ocorre, por exemplo, com *Cacao swollen shoot virus* e um

Badnavirus não identificado oriundo de cana-de-açúcar (FRISON e PUTTER, 1993). No entanto, até o momento não se conseguiu a transmissão mecânica da maioria das espécies deste gênero.

Badnavirus também podem ser transmitidos pela semente, como é o caso de *Badnavirus* oriundo de bananeira (possivelmente, o *Banana streak MY virus*), *Cacao swollen shoot virus*, *Citrus yellow mosaic virus*, *Commelina yellow mottle virus*, *Kalanchoe top spotting virus*, *Piper yellow mottle virus* (HEARON e LOCKER, 1984, MEDBERRY et al., 1990; DANIELLS et al., 1995; QUAINOO et al., 2008; HAREESH e BHAT, 2010).

As partículas dos *Badnavirus* são encontradas em todas as partes das plantas hospedeiras (lâmina foliar, nervura, pseudocaule, raízes, casca de fruto). Ainda não foi detectada a presença de inclusões virais nas células infectadas por *Badnavirus*, no entanto, algumas espécies vegetais infectadas podem apresentar, no citoplasma, estruturas membranosas como *Canna* sp. infectada com o *Canna yellow mottle virus* ou tubulares como comelina infectada com o CoYMV e *Rubus idaeas* infectada com o *Rubus yellow net virus* (JONES et al., 1974; JONES e ROBERTS, 1976; DAHAL et al., 1998).

Genoma de *Badnavirus* contém uma única molécula de dsDNA variando de 7200-7800 pb dependendo da espécie. A molécula forma um círculo aberto interrompido por descontinuidades (uma fita principal e uma fita complementar) sítio-específicas, fazendo com que a mesma tenha uma formato de molécula circular relaxada, que podem conter uma região intergênica poli (A) (MEDBERRY et al., 1990). Essas descontinuidades representam domínios relacionados à síntese de DNA durante a replicação.

De um modo geral o genoma codifica para três “Open Reading Frames” ORFs (HARPER e HULL, 1998), sendo que as duas primeiras ORFs codificam, respectivamente, para uma proteína de 20,8 a 23 kDa denominada de P1 (ORF1) de função desconhecida e a proteína de 14,5 a 15 kDa denominada de P2 (ORF2) cuja função está associada á encapsidação do vírion (CHENG et al., 1996; JACQUOT et al., 1996; STAVOLONE et al., 2001). A terceira ORF (ORF3) codifica uma poliproteína de 208 a 216 kDa que é proteoliticamente clivada e gera, dentre outros produtos, a proteína de movimento, a proteína do capsídeo viral, a aspartato protease (AP) (responsável pela clivagem da poliproteína), a transcriptase Reversa (RT) e a Ribonuclease H1 (MEDBERRY et al., 1990; TZAFRIR et al., 1997; HARPER e HULL, 1998). Em alguns casos podem estar presentes uma ou quatro ORFs adicionais, cujas funções ainda estão sendo estudadas (BOUHIDA et al., 1993; HAGEN et al., 1993).

Os genomas de *Badnavirus* têm sido relatados como sendo altamente variáveis, portanto, a maioria dos pares de primers para PCR utilizados para sua detecção foram desenhados a partir de três regiões conservadas que ocorrem na ORF III (MEDBERRY et al., 1990), representando o domínio tRNAMet e as regiões da RNase H e RT (LOCKHART; OLSZEWSKI, 1993; GEERING et al., 2000). Adicionalmente, para a alta variabilidade genética de badnavírus, a recente descoberta da integração de BSV no genoma da planta, acarreta em dificuldades de testes confiáveis de diagnóstico além de dificultar o intercâmbio internacional de germoplasma. A integração de partes do genoma de BSV em espécies de *Musa*, foi primeiramente apontado por LAFLEUR et al., (1996) através de hibridização, e demonstrado adicionalmente por técnicas moleculares e citogenéticas por HARPER et al., (1999), entre outros.

Em se tratando de bananeira (*Musa* spp.), dependendo da espécie de *Badnavirus*, é conhecido ocorrer integração de sequências de DNA homólogas às sequências de *Badnavirus* no genoma da espécie botânica, essas sequências são denominadas de EPRVs (“Endogenous Pararetrovirus Sequences”) (HARPER et al., 1999). Dois tipos são conhecidos: (1) as que mostram homologia com o genoma incompleto do vírus e são incapazes de gerar vírions e causar infecção; (2) as que mostram homologia com o genoma completo do vírus e são capazes de gerar vírions, após certas condições de *stress* (em especial, a cultura de tecidos) a que a planta é sujeita (estas sequências são denominadas “Endogenous Activatable BSV Sequences” – eaBSVs), caracterizando posteriormente a infecção epissomal (o DNA viral permanece circular na célula do hospedeiro, não estando integrado ao DNA da mesma). Aparentemente, eaBSVs só tem sido detectado no genoma B (oriundo de *M. balbisiana*) (JAMES et al., 2011).

A replicação dos *Badnavirus* é similar aos dos *Retrovirus*, pois sua transcrição é assimétrica para dar um RNA intermediário (RNA de fita simples – ssRNA) através de transcrição reversa, de forma a produzir um RNA com alguns dos produtos gênicos. Esta é a razão de alguns autores denominarem os vírus do gênero *Badnavirus* como pararetrovirus.

O tipo de replicação é citoplasmática/nuclear, ou seja, o vírion chega à célula, sendo desencapsidado pela ação de proteinases celulares e libera o dsDNA genômico, que é transportado para o núcleo, as descontinuidades do DNA são reparadas e “mini-cromossomos” são formados. Tal DNA é transcrito pela RNA polymerase II do hospedeiro (HARPER e HULL, 1998; HULL, 2001; SCHENK et al., 2001). O RNA transcrito é traduzido nos ribossomos, resultado nos produtos protéicos relacionados aos genes virais existentes (FÜTTERER et al.,

1997; POOGGIN et al., 1999). O RNA pré-genômico é retrotranscrito pela transcriptase reversa no citoplasma produzindo novos dsDNA genômicos (MEDBERRY et al., 1990). Os dsDNA genômicos são encapsidados com a proteína capsidial, produzindo novos vírions.

Em geral, os *Badnavirus* são detectados através de microscopia eletrônica de transmissão, microscopia eletrônica de imuno-adsorção, testes sorológicos, como ELISA e suas modalidades ou testes baseados no DNA (VEGA e SORDI, 1991; DELANOY et al., 2003; RIVAS et al., 2005; 2006; FIGUEIREDO et al., 2006; ANDRADE, 2007; POLTRONIERI et al.; 2009; ALEXANDRE et al., 2010; BRIOSO et al., 2011; JAMES et al., 2011; PENG et al., 2012). Os testes baseados em DNA utilizam *primers* específicos ou degenerados e são mais sensíveis e práticos, no entanto geralmente não conseguem distinguir as formas epissomais do vírus das sequencias integradas ao genoma do hospedeiro.

2.6. Badnavírus na cultura da cana-de-açúcar

A cana-de-açúcar é vulnerável a diversas doenças disseminadas pelo uso de colmos contaminados, sendo que a monocultura em extensas áreas favorece o surgimento de epidemias. A planta matriz pode se mostrar infectada sem apresentar qualquer sintoma externo, aumentando os riscos de disseminação de doenças para novas áreas (CHATENET et al., 2001).

Atualmente duas espécies de *Badnavirus*, foram descritas infectando cana-de-açúcar no mundo *Sugarcane bacilliform IM virus* e *Sugarcane bacilliform MO virus*. A primeira foi descrita em Cuba sobre *S. officinarum* apresentando estrias cloróticas ou em infecção latentes (RODRIGUEZ LEMA et al., 1985; LOCKHART e AUTREY, 1988). Essa espécie também já foi relatada na Austrália, nos Estados Unidos e no Marrocos e tem como vetor a cochonilha *Saccharicoccus sacchari* Cockerell (JONES e LOCKHART, 1993). Além de *Saccharum* spp., o vírus infecta plantas de bananeira em condições experimentais (LOCKHART, 1995).

O outro *Badnavirus* que infecta a cana-de-açúcar é *Sugarcane bacilliform MO virus*, relatado nos Estados Unidos sobre *S. officinarum* (BOUHIDA et al., 1993) apresentando estrias cloróticas. Ainda não se conhece o vetor desse vírus em condições naturais sendo transmitido apenas por propagação vegetativa, mas em condições experimentais o vírus pode infectar *M. acuminata* (BOUHIDA et al., 1993).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Obtenção das amostras

Foram coletadas amostras de folhas jovens de cana-de-açúcar provenientes do banco de germoplasma da Estação de Floração e Cruzamento da Cana-de-Açúcar da Serra do Ouro, situada em Murici – Alagoas, nas seguintes coordenadas 09°13'S; 35°50'W. A estação, que ocupa uma área de 32 hectares, se localiza a 34 km de distância geográfica do litoral e está situada a 515m de altitude. A pluviosidade anual média é de 2.363mm e as temperaturas mínima e máxima médias são 18,2°C e 27,9°C, respectivamente.

No total foram amostrados 200 genótipos incluindo-se os principais materiais genéticos utilizados nos cruzamentos da RIDESA. Algumas plantas coletadas exibiam sintomas de clorose e estrias cloróticas (Figura 1), enquanto outras estavam assintomáticas. Após as coletas as amostras foram encaminhadas ao Laboratório de Virologia Vegetal do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Alagoas.

3.2. Análise da Incidência de Badnavírus

A incidência de badnavírus na Estação de Floração e Cruzamentos da Serra do Ouro foi baseada em PCR, sendo obtida pela razão entre o número de amostras positivas e o total de amostras analisadas.

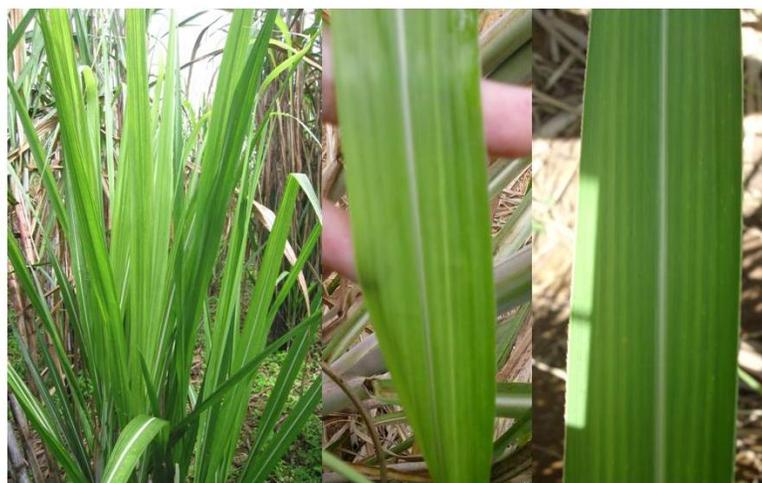
**A****B****C**

Figura 1. Plantas de cana-de-açúcar apresentando clorose (A e B) e estrias cloróticas (C), sugestivos de infecção viral.

A extração do DNA total foi realizada a partir de discos foliares de aproximadamente 1 cm de diâmetro seguindo-se o protocolo descrito por Doyle & Doyle (1987). O DNA total serviu de molde para as reações de amplificação por PCR na presença dos oligonucleotídeos BadnaFP (5'-ATGCCITTYGGIITIAARAAYGCICC-3') e BadnaRP (5'-CCAYTTRCAIACISCICCCCAICC-3') desenhados com base nos domínios RT/RNaseH da ORF 3 do genoma de vários *Badnavirus* já descritos (YANG et al., 2003).

As reações foram realizadas em volume total de 60 µL, contendo 6 µL de tampão 10X (KCl 100 mM, Tris-HCl 100 mM pH 9,0, Triton-X 1%), 4,8 µL de dNTPs 2,5 mM, 1,8 µL de MgCl₂ 50 mM, 3 µL de cada oligonucleotídeo (10 µM), 1 U da Taq DNA Polimerase, 1 µL de DNA (10 a 100 ng) e 40 µL de água ultrapura. As condições de amplificação foram: desnaturação inicial de 94°C por 4 min, 94°C por 30 s, 50°C por 30 s, 72°C por 30 s. Os ciclos foram repetidos 35 vezes exceto o passo inicial e a extensão final a 72°C por 10 min. Após a amplificação, os produtos foram analisados em gel de agarose a 0,8%, em tampão TBE (Tris-Borato, EDTA 0,5M pH 8,0), corado com brometo de etídeo e visualizado sobre luz ultravioleta.

3.3. Caracterização de *Badnavirus*

Os produtos da amplificação foram purificados utilizando-se o kit GFX PCR DNA and Gel Band Purification (GE Healthcare). O sequenciamento foi realizado comercialmente (Macrogen Inc., Seul, Coréia do Sul), diretamente a partir dos produtos de PCR purificados. As sequências de nucleotídeos foram inicialmente submetidas ao algoritmo BLAST_n para atribuição preliminar das espécies com base no nível limite de 80% estabelecido pelo ICTV (GEERING & HULL, 2011). As sequências foram alinhadas com base no algoritmo MUSCLE disponível no programa MEGA 5 (TAMURA et al., 2011). Árvores iniciais foram construídas usando o método Neighbour-Joining. Estas foram posteriormente comparadas com as árvores de consenso construídas a partir de análise de máxima verossimilhança com "bootstrap" de 2000 repetições. Sequências de outras espécies pertencentes à família *Caulimoviridae*, disponíveis no GenBank, foram incluídas nas análises para comparação (Tabela 4).

Comparações pareadas ("pairwise sequence comparison", PASC) foram geradas utilizando-se o programa DNAMAN versão 6 (Lynnon Biosoft Corporation) a fim de estimar a porcentagem de identidade entre as sequências de nucleotídeos dos isolados. As sequências foram alinhadas com base no algoritmo MUSCLE disponível no programa MEGA 5 (TAMURA et al., 2011).

Tabela 4. Sequências depositadas no Genbank e utilizadas na construção da árvore filogenética e nas comparações par-a-par.

Vírus (Acrônimo)	Nº de acesso no Genebank
<i>Banana streak Mysore virus (BSMYV)</i>	NC006955
<i>Banana streak OL virus (BSOLV)</i>	NC_003381
<i>Banana streak VN virus (BSVNV)</i>	NC_007003
<i>Bougainvillea chlorotic vein banding virus (BCVBV)</i>	NC_011592
<i>Cacao swollen shoot virus (CSSV)</i>	NC_001574
<i>Citrus mosaic virus (CiMV)</i>	NC_003382
<i>Commelina yellow mottle virus (ComYMV)</i>	NC_001343
<i>Dioscorea bacilliforma SN virus (DBSNV)</i>	NC_009010
<i>Dracaena mottle vírus (DrMV)</i>	NC_008034
<i>Kalanchoe top-spotting virus (KTSV)</i>	NC_004540
<i>Pelargonium vein banding vírus (PIVBV)</i>	NC_013262
<i>Rice tungro bacilliform virus (RTBV)</i>	X57924
<i>Sugarcane bacilliform IM virus (SCBIMV)</i>	NC_003031
<i>Sugarcane bacilliform Mor virus (SCBMV)</i>	NC_008017
<i>Taro bacilliform viruso (TaBV)</i>	NC_004450

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Incidências de *Badnavirus* no banco de germoplasma da cana-de-açúcar da Serra do Ouro

Dentre as 200 amostras de cana-de-açúcar avaliadas para a detecção de *Badnavirus* mediante a técnica de PCR, 73 foram positivas, correspondendo a uma incidência de 36,5%. Os amplicons tiveram tamanho aproximado de 580 pb (Figura 2), conforme o esperado para as ampliações com os primers utilizados (YANG et al., 2003). A tabela 5 em anexo relaciona todas as amostras testadas, discriminando as positivas e negativas. Dentre as amostras positivas encontram-se diversos genótipos muito utilizados por pesquisadores da RIDESA para o desenvolvimento de variedades superiores.

Até o presente estudo existia apenas um relato de cana-de-açúcar infectada com *Badnavirus* no Brasil (SORDI e VEGA, 1991). Baseado apenas em microscopia eletrônica, sendo impossível identificar a espécie correspondente do vírus. Sua ocorrência em cana-de-açúcar, também foi assinalada em Cuba, Estados Unidos, Marrocos e Austrália (COMSTOCK e LOCKHART, 1990; LOCKHART e AUTREY, 1988; VISWANATHAN ET AL., 1996).

A incidência de 36,5% é considerada alta, principalmente para um banco de germoplasma e de certa forma é preocupante, pois os *Badnavirus* podem ser transmitidos pelo pólen e pela semente (FRISON E PUTTER, 1993). Assim, cruzamentos envolvendo plantas infectadas podem resultar em plântulas doentes, as quais por sua vez podem ser selecionadas e multiplicadas vegetativamente originando grandes áreas comerciais completamente infectadas. Por outro lado as plântulas infectadas podem mostrar subdesenvolvimento e serem descartadas ao longo dos ciclos de seleção levando a perdas de materiais genéticos promissores.

Outro fator que deve ser levado em consideração é que a incidência de *Badnavirus* aumente no banco de germoplasma, em decorrência da dispersão desses vírus por vetores, implementos agrícolas e pólen. Considerando os efeitos negativos do vírus na fisiologia da planta (redução na atividade fotossintética, alterações hormonais, nanismo, deformações...) e que esses efeitos se agravam com o tempo, os genótipos infectados podem ser perdidos, trazendo um prejuízo muito grande ao Programa de Melhoramento Genético da RIDESA.

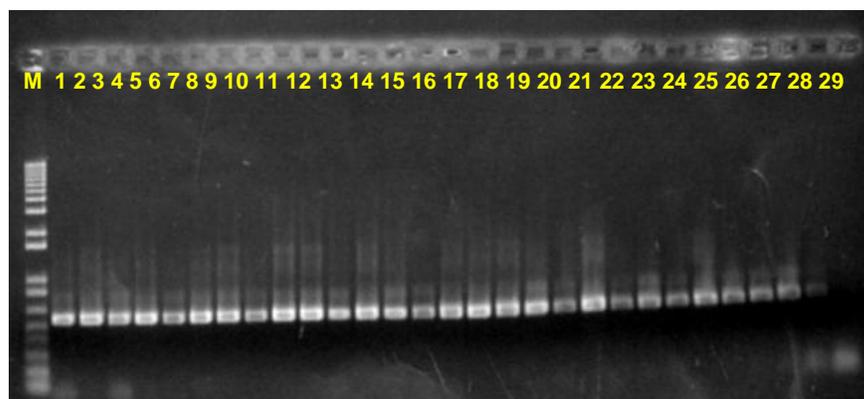


Figura 2. Amplicons obtidos a partir do DNA total extraído de plantas de cana-de-açúcar na presença dos primers BADNAFF e BADNAFP. **M**, marcador (1 Kb plus DNA ladder); **1**: controle positivo; **2 a 28**: Isolados de cana-de-açúcar da Serra-do-ouro, Murici, Alagoas; **29**: controle negativo.

4.2. Caracterização dos Badnavirus de ocorrência no Banco de Germoplasma da Estação de Floração e Cruzamentos da Serra do Ouro

Das 73 amostras positivas por PCR 32 foram sequenciadas e as sequências nucleotídicas correspondentes empregadas para análise filogenética utilizando-se máxima verossimilhança. A árvore filogenética resultante apresentou um ramo monofilético significativamente suportado pelos valores de *bootstrap* (Figura 3). Os isolados caracterizados foram distribuídos em cinco grupos, os quais provavelmente correspondem a cinco espécies distintas de *Badnavirus*.

O grupo I concentrou o maior número de isolados (13), os quais correspondem à espécie *Banana streak OL virus* (BSOLV), até então relatada apenas em plantas de *Musa* spp. em diversos países (LOCKHART e OLSZEWSKI, 1993), inclusive no Brasil (BRIOSO et al., 2000). Os grupos II, III e IV, com quatro, um e dois isolados, respectivamente, não agruparam com nenhuma das sequências depositadas no Genbank utilizadas nesse trabalho, sugerindo a presença de nova espécie de *badnavirus* ainda não descritas. O grupo V englobou 12 isolados que agruparam com o *Sugarcane bacilliform MO virus* (SCBMV).

As análises pareadas (Figura 4) corroboraram integralmente os resultados obtidos na filogenia, ou seja, cada grupo da árvore incluiu apenas isolados que compartilhavam 80% ou mais de identidade de sequência, o que de acordo com o ICTV é um critério decisivo para demarcação de espécies do gênero *Badnavirus*.

A alta diversidade de espécies de *Badnavirus* no Banco de germoplasma da Estação de Floração e Cruzamentos da Serra do Ouro, possivelmente é consequência da introdução de genótipos de cana-de-açúcar procedentes de diversos países, prática iniciada durante a década de 1970, quando esses vírus ainda eram desconhecidos e ainda não se dispunham de ferramentas apropriadas para sua detecção.

Os dados obtidos nesse trabalho sugerem que os badnavírus que foram introduzidos e se estabeleceram no banco de germoplasma da serra do ouro, estão sendo disseminados por vetores ou por instrumentos utilizados no corte da cana. Essa hipótese é plausível, pois se observou diferenças nas variedades em que os *Badnavirus* foram detectados. Por exemplo, os isolados mais relacionados ao BSV (Grupo I da árvore filogenética) foram detectados em variedades procedentes do Havaí, Austrália, Índia, Porto Rico, Barbados e Brasil. Outra hipótese seria a de que após a introdução os *Badnavirus* estariam se disseminando integrados ao genoma do hospedeiro, como ocorre com o BSV em bananeira (LOCKART, 1995), por meio de grãos de pólen ou através de sementes de genótipos produzidos no próprio banco. Contudo, se esperaria uma maior uniformidade das seqüências de isolados de uma mesma espécie, uma vez que a replicação seria por meio da DNA polimerase do hospedeiro, que apresenta maior precisão que a replicase viral (MEDBERRY et al, 1990).

O SCBV tem sido encontrado em várias espécies de cana-de-açúcar ao redor do mundo e é especialmente comum em *S. officinarum* e em canas nobres (COMSTOCK e LOCKHART, 1990) as quais são utilizadas em programas de melhoramento. Embora SCBV esteja presente na maioria das áreas de plantio de cana, pouco se sabe sobre a variabilidade, virulência e efeitos desse vírus sobre a produção. Mesmo que alguns testes tenham sido realizados para a detecção do SCBV, estes ainda possuem sérias limitações. A alta variabilidade relatada entre isolados de SCBV (SMITH et al., 1996; BRAITHWAITE et al., 1997) e a estreita relação com o BSV (LOCKHART e OLSZEWSKI, 1993) tem implicado em sérios problemas para a diagnose.

Braithwaite e colaboradores (1997), fazendo comparações entre as regiões intergênicas e a RNase H de quatro isolados de SCBV e dois isolados de BSV, revelaram a similaridade de 90%

entre alguns dos isolados das duas espécies, o que levantou a hipótese de que eles poderiam se tratar do mesmo vírus e não de espécies diferentes (LOCKHART e AUTREY, 1991), que existiria um contínuo em vez de isolados diferentes (BRAITHWAITE et al., 1997) e isso explicaria a aparição de BSV em cana-de-açúcar com grande frequência. No entanto neste trabalho os isolados de cada espécie apresentaram diferenças significativas (menor que 80%) comprovando a separação em espécies distintas.

Segundo Muller e colaboradores (2011) a análise filogenética baseada na região RT/RNaseH também demonstrou que não há uma separação clara entre SCBV e BSV em grupos de Badnavirus distintos. A estreita relação entre SCBV e BSV com a estrutura polifilética de BSV (GAYRAL e ISKRA-CARUANA, 2009) é um forte argumento que suporta a hipótese de que banana e cana-de-açúcar tenham um ancestral em comum, ou ainda que a banana pode ter sido o hospedeiro ancestral para SCBV bem como para outros badnavirus que agrupam com BSV (GAYRAL e ISKRA-CARUANA, 2009).

A alta incidência e diversidade de *Badnavirus* observadas nesse estudo reforçam a tendência do aparecimento de espécies de BSV em Cana-de-açúcar. A emergência de novas espécies de badnavirus, ou mesmo a disseminação de espécies agressivas já existentes, podem levar a perda de importantes materiais genéticos e dificultar o intercâmbio dos mesmos e apontam para a necessidade de substituir os materiais infectados e de adotar medidas que impeçam a infecção de outros genótipos.

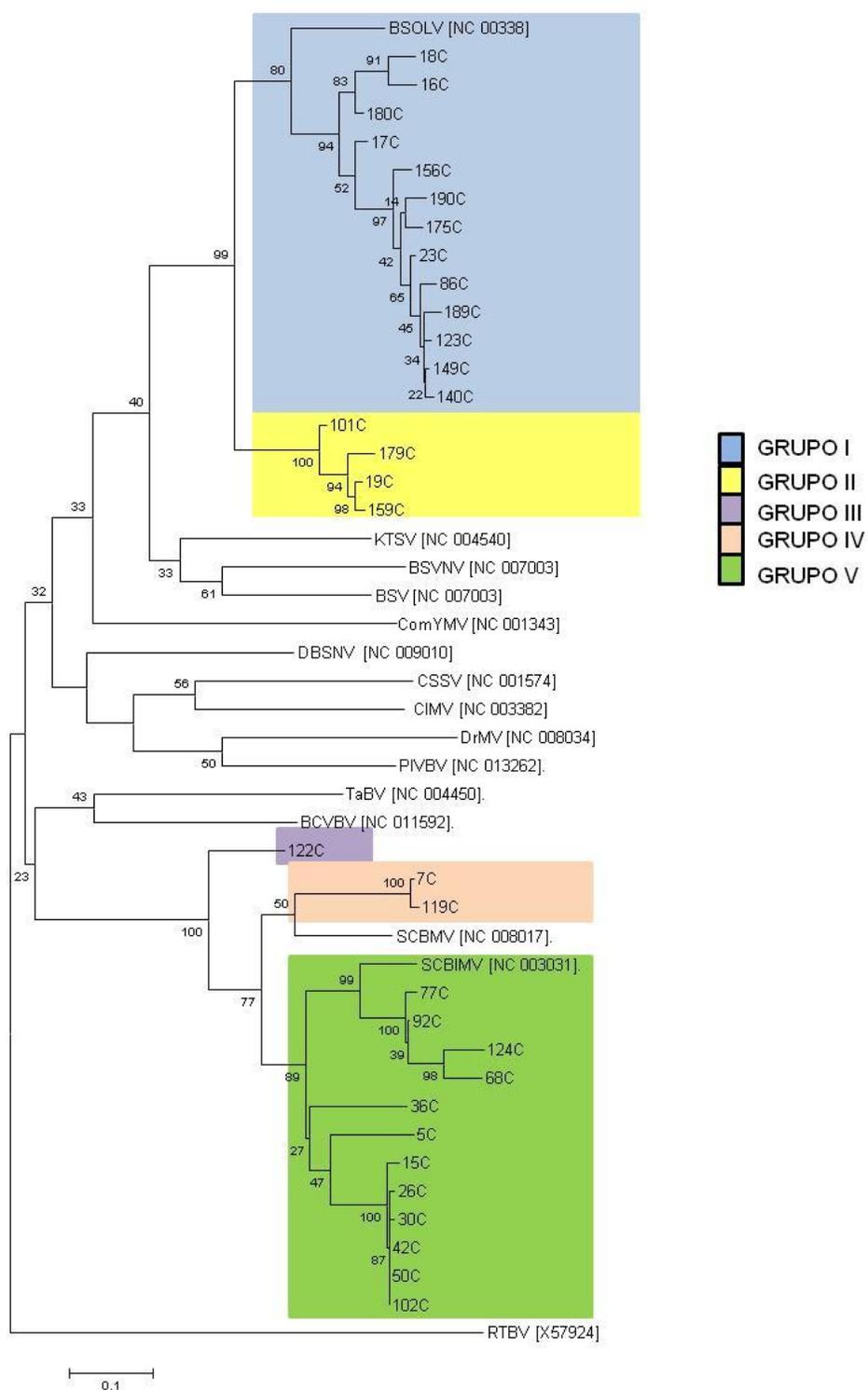


Figura 3. Árvore de máxima verossimilhança baseada nas sequências de um fragmento de 579 pares de bases correspondente à região RT/RNase H do genoma de badnavírus. Os números nos ramos indicam valores de "bootstrap" (2.000 repetições).

5. CONCLUSÃO

Foi verificada alta incidência (36,5%) de *Badnavirus* na Estação de Floração e Cruzamentos da Cana-de-Açúcar da Serra do Ouro. Os *Badnavirus* detectados pertencem a cinco espécies distintas, sendo duas já conhecidas (*Banana streak virus* e *Sugarcane baciliforme Mo virus*) e três prováveis novas espécies.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRIANUAL. Anuário da Agricultura Brasileira. São Paulo: Ed. Brasilform, 2005.

AHLAWAT, Y.S.; PANT, R.P.; LOCKHART, B.E.; SRIVASTAVA, M.; CHAKRABORTY, N.K. & VARMA, A. 1996a. Association of a badnavirus with citrus mosaic disease in India. *Plant Dis.* 80: 590-2.

ALBUQUERQUE, F.C.; TRINDADE, D.R.; POLTRONIERI, L.S.; DUARTE, M.L.R.; BRIOSO, P. S.T.; REZENDE, J.A.M.; KITAJIMA, E.W. 1999. Evidências preliminares da ocorrência do vírus do mosqueado da pimenteira-do-reino (Piper yellow mottle virus - PYMV) no Brasil. *Summa Phytopathol.* 25:36.

ALEXANDRE, M.A.V.; DUARTE, L.M.L.; RIVAS, E.B. ; GALLETI, S.R. 2010. Vírus detectados em plantas ornamentais no período 2004 a 2008. *Rev. Bras. Hortic. Ornam.* 16:95-100.

AMALRAJ, V.A.; BALASUNDARAM, N. On the taxonomy of the members of „Saccharum complex“. *Genetic Resource Crop Evolution*, v. 53, p. 35-41, 2006.

ANDRADE, G. P. 2007. Comitê diagnóstico fitossanitário da cultura do inhame (*Dioscorea* spp.) em áreas produtoras do nordeste do Brasil. Tese. UFRPE.

BARANWAL, V.K.; S MAJUMDER, Y S AHLAWAT & R P SINGH. 2005. A novel approach for simultaneous detection of Citrus yellow mosaic virus and Citrus greening bacterium by multiplex polymerase chain reaction. *Indian J. Biotec.* 4:528-33.

BARBOSA G V S, SOUZA A J R, ROCHA A M C, SANTOS A V P, RIBEIRO C A G, BARRETO E J S, MOURA FILHO G, SOUZA J L, FERREIRA J L C, SOARES L, CRUZ M M, FERREIRA P V, SILVA W C M (2003) Três novas variedades RB de cana-de-açúcar. Rio Largo. *Boletim Técnico.* n.2, 17p.

BESSE, S.; GUGERLI, P.; RAMEL, M.E. & BALMELLI, C. 2010. Characterisation of mixed virus infections in *Ribes* species in Switzerland. 1st International Conference on Virus and other Graft Transmissible Diseases of Fruit Crops. *Julius Kühn Arch.* 427:214-9.

BHAT, A.I.; DEVASAHAYAM, S.; SARMA, Y.R. & PANT, R.P. 2003. Association of a badnavirus in black pepper (*Piper nigrum* L.) transmitted by mealybug (*Ferrisia virgata*) in India. *Curr. Sc.* 84:1547-50.

BOUSALEM, M.; DOUZERY, E.J.P.; SEAL, S.E. Molecular taxonomy, phylogeny, and evolution of plant reverse transcribing viruses (Caulimoviridae) inferred from the reverse transcriptase sequences. *Archives Virology*, v. 153, p.1085-1102. 2008.

BOARI, A.J.; AZEVEDO, V.G. ; SILVA-MANN, R.; FRANCO Fo., E. & KITAJIMA, E.W. 2005. Ocorrência de potyvirus e badnavirus em inhame (*Dioscorea* sp.) no estado de Sergipe. *Summa Phytopathol.* 31:35-6.

BOHIUDA, M.; LOCKHART, B.E.L. & OLSZEWSKI, N.E. 1993. An analysis of the complete sequence of a Sugarcane bacilliform virus genome infection to banana and rice. *J. Gen. Virol.* 74:15-22.

BRIOSO, P.S.T.; CORDEIRO, Z.J.M.; REZENDE, J.A.M.; KITAJIMA, E.W.; PIMENTEL J.P.; FIGUEIREDO, A.R. 2000. 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 Phytopathol.* 26:254-7.

BRIOSO, P.S.T.; KITAJIMA, E.W.; CORDEIRO, Z.J. ; REZENDE, J.A.M.; MONTANO, H.G.; PIMENTEL, J.P. 1997. Infecção mista de Cucumber mosaic virus e de badnavirus em bananeira cv. mysore. *Fitopatol. Bras.* 22:332.

BRIOSO, P.S.T.; FIGUEIREDO, D.V.; POZZER, L.; KITAJIMA, E.W. 2003. Associação de badnavirus com a Clorose Anelar de *Schefflera* sp. *Fitopatol. Bras.* 28:247.

BRIOSO, P.S.T.; PEREIRA, J.C.R. & GASPAROTTO, L. 2011. Ocorrência de Badnavirus em frutos de bananeira no estado do Amazonas, Brasil. *Rev. Bras. Frutic.* 33:1353-5.

CHAGAS, C.M.; ALEXANDRE, M.A.V.; DUARTE, L.M.L.; RIVAS, E.B.; TOMBOLATO, A.F.C. 2001. Badnavirus-like particles associated with chlorotic vein-banding symptoms in *Boungainvillea spectabilis*. *Virus Res.* 6:153-4.

CHATENET, M., DELAGE, C., RIPOLLES, M., IREY, M., LOCKHART, B.E.L. & ROTT, P. Detection of *Sugarcane yellow leaf virus* in quarantine and production of virus-free sugarcane by apical meristem culture. *Plant Disease* 85:1177-1180. 2001.

CHENG, C.; LOCKHART, B.E.L. & OLSZEWSKI, N.E. 1996. The ORF I and II proteins of Commelina yellow mottle virus are virion-associated. *Virology* 223: 263-71.

COMSTOCK, J. C. & LOCKHART, B. E. L. 1996. Effect of sugarcane bacilliform virus on biomass production of three sugarcane cultivars. *Sugar Cane* 4:12-5.

CONAB 2012 (Companhia Nacional de Abastecimento). Disponível em: http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/12_12_12_10_34_43_boletim_cana_portugues_12_2012.pdf (30 de janeiro 2013).

DAHAL, G.; PASBERG-GAUHL, C.; GAUHL, F.; THOTTAPPILLY, G.; D'A HUGHES, J. 1998. Studies on a Nigerian isolate of Banana streak Badnavirus: II. Effect of intraplant variation on virus accumulation and reliability of diagnosis by ELISA. *Ann. Appl. Biol.* 132:263-75.

DAHAL, G.; PASBERG-GAUHL, C.; GAUHL, F.; THOTTAPPILLY, G.; D'A HUGHES, J. 1998. Studies on a Nigerian isolate of Banana streak Badnavirus: II. Effect of intraplant variation on virus accumulation and reliability of diagnosis by ELISA. *Ann. Appl. Biol.* 132:263-75.

DANIELS, J. AND ROACH, B.T. 1987. Taxonomy and evolution. p.7-84. In Heinz, D.J. (ed.) *Sugarcane improvement through breeding*. Elsevier, Amsterdam.

DANIELLS, J.; THOMAS, J. E. & SMITHS, B. J, 1995. Seed transmission of banana streak badnavirus confirmed. *Infomusa* 4:7.

DELANOY, M.; SALMON, M.; KUMMERT, J.; FRISON, E. & LEPOIVRE, P. 2003. Development of realtime PCR for the rapid detection of episomal Banana streak virus (BSV). *Plant Dis.* 87:33-8.

DUARTE, M.L.R.; ALBUQUERQUE, F.C.; POLTRONIERI, L.S.; TRINDADE, D.R.; KITAJIMA, E.W. & BRIOSO, P.S.T. 1999. Mosqueado amarelo da Pimenta-do-Reino causado pelo PYMV. *Fitopatol. Bras.* 24:352.

FAUQUET C., MAYO, M., MANILOFF, J., DESSELBERGER, U., BALL, L. Virus taxonomy. Eight Report of the International committee on Taxonomy of Viruses. Amsterdam. Elsevier. 2005.

FIGUEIREDO, D.V. & BRIOSO, P.S.T. 2007. PCR multiplex para a detecção de BSV e CMV em bananeiras micropropagadas. Summa Phytopathol. 33:229-32.

FIGUEIREDO, D.V.; MEISSNER FILHO, P.E.; SILVA-NETO, S.P. & BRIOSO, P.S.T. 2006. Detecção e análise da variabilidade de sequências do Banana streak virus (BSV) em bananeiras no Brasil. Summa Phytopathol. 32: 118-23.

FIGUEIREDO, D.V.; CUNHA JUNIOR, J.O.; NOGUEIRA, M.S.R.; MONTANO, H.G. & BRIOSO, P.S.T. 2006. Produção de sondas não radioativas para a detecção de vírus em bananeira. Fitopatol. Bras. 31:204.

FRISON, E.A. ; PUTTER, C.A.J. (eds.). 1993. FAO/IBPGR Technical Guidelines for the Safe Movement of Sugarcane Germplasm. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome/ International Board for Plant Genetic Resources, Rome.

FÜTTERER, J.; ROTHNIE, H.M.; HOHN, T. & POTRYKUSL. 1997. Rice tungro bacilliform virus open read frame II and III are translated from polycistronic pre genomic RNA by leaky scanning. J. Virol. 71:7984-9.

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

GAUHL F., PASBERG-GAUHL,C., HUGHES, J. D'A. First report of banana streak badnavirus in plantain landraces in southern Cameroon, Central Africa. Plant Disease, v. 81, p. 1335-1335, 1997.

GEERING, A.D.W. 2009. Viral pathogens of banana: outstanding questions and options for control. Acta Hort. 828 39-50.

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

GEIJSKES, R.J. 2003. Characterisation of an australian isolate of Sugarcane bacilliform virus. PhD Thesis. Queensland University of Technology.

HAGEN, L.S.; JAQUEMOND, M.; LEPINGLE, A.; LOT, H. & TEPFER, M. 1993. Nucleotide sequence and genomic organization of Cacao swollen shoot virus. *Virology* 196:619-28.

HAREESH, P.S. & BHAT, A.I. 2010. Seed transmission of Piper yellow mottle virus in black pepper (*Piper nigrum* L). *J. Plant. Crops* 38:62-5.

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

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

HARPER, G. ; HULL, R. 1998. Cloning and sequence analysis of Banana streak virus DNA. *Virus Genes* 17: 271-8.

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.

HEARON, S.S. ; LOCKE, J.C. 1984. Graft, pollen and seed transmission of an agent associated with top spotting in *Kalanchoe blossfeldiana*. *Phytopathology* 74:347-50.

HULL, R. (Ed.). 2001. *Matthew's Plant Virology*. Academic Press, San Diego, USA.

ICTVdB. Descriptions of Plant Viruses: Notes on Genus: Badnavirus. The Universal Virus Database, version 4. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/ICTVdB/>.

JACQUOT, E.; HAGEN, L. S.; JAQUEMOND, M. & YOT, P. 1996. The open reading frame 2 product of cacao swollen shoot badnavirus is a nucleic acid-binding protein. *Virology* 225:191-195.

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

JONES, D.R. & LOCKHART, B.E.L. 1993. Banana streak disease. *Musa Fact Sheet No 1*. International Network for Improvement of Banana and Plantain. Montpellier, France.

JONES, A. T. ; ROBERTS, I. M. 1976. Ultrastructural changes and small bacilliform particles associated with infection by rubus yellow net virus. *Ann. Appl. Biol.* 84:305-10.

JONES, A. T.; ROBERTS, I. M. ; MURANT, A. F. 1974. Association of different kinds of bacilliform particle with vein chlorosis and mosaic diseases of raspberry (*Rubus idaeus*). *Annals of Applied B. Ann. Appl. Biol.* 77 (3):283-8.

KING, A.M.Q.; ADAMS, M.J.; CARSTENS, E.B. ; LEFKOWITZ, E.J. (Eds.). 2012. *Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses: ninth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. International Union of Microbiological Societies. Virology Division. Academic Press: London. 1327pp

LAFLEUR, D. A.; LOCKHART, B.E.L.; OLSZEWSKI, N.E. Portions of the banana streak badnavirus genome are integrated in the genome of its hosts *Musa* spp. *Phytopathology*, v. 86, p. 100-101, 1996.

LIMA J P R (1997) O setor sucro-alcooleiro do Nordeste: evolução recente e a reestruturação possível, p.9-32. In: workshop sobre avaliação e manejo dos recursos naturais em área de exploração da cana-de-açúcar, Aracaju.

LLORENS, C.; MUNOZ-POMER, A.; BERNARD, L.; BOTELLA, H.; MOYA, A. Network dynamics of eukaryotic LTR retroelements beyond phylogenetic trees. *Biology Direct*, v. 4, p.41, 2009.

LOCKART, B.E. 1995. Banana Streak Badnavirus infection in *Musa*: Epidemiology, diagnosis and control. Food and Fertilizer Technology Center. *Tech. Bull.* 143.

LOCKHART, B. E. L.; OLSZEWSKI, N.E. Serological and genomic heterogeneity of banana streak badnavirus: implications for virus detection in *Musa* germplasm, *Breeding Banana and Plantain for Resistance to Diseases and Pests*. CIRAD/INIBAP, p. 105-113, 1993.

LOCKHART, B. E. L. & AUTREY, L. J. C. 1988. Occurrence in sugarcane of a bacilliform virus related serologically to banana streak virus. *Plant Dis.* 72:230-3.

MATSUOKA S, GARCIA A A F, ARIZONO H (2005) Melhoramento da cana-de-açúcar, p.205-251. In Borém A (Ed) Melhoramento de espécies cultivadas. Viçosa, Editora: UFV, 969p.

MEDBERRY, S. L.; LOCKHART, B. E. L.; OLSZEWSKI, N. E. Properties of Commelina yellow mottle virus complete DNA sequence, genomic discontinuities and transcript suggest that it is a pararetrovirus. *Nucleic Acids Research*, v. 18, p.5505-5513, 1990.

MIGLIORI, A. ; LASTRA, R. 1978. Study of viruses on *Commelina diffusa* Burm. in Guadeloupe. *Ann. Phytopathol.* 4:467-77.

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

PENG, J.; GUO, L. ; WANG, G. 2012. Development of a LAMP method for rapid detection of Banana streak virus. *Acta Phytopathol. Sin.* 42: 2.

POLTRONIERI, L.S.; FIGUEIREDO, D.V.; BRIOSO, P.S.T.; VERZIGNASSI, J.R. ; CARDOSO, S.S. 2009. Constatação do Banana streak Uganda B virus em bananeiras no Estado do Pará. *Summa Phytopathol.* 35:74.

POOGGIN, M. M., FUTTERER, J., SKRYABIN, K. G.; HOHN, T. 1999. A short open reading frame terminating in front of a stable hairpin is the conserved feature in pregenomic RNA leaders of plant pararetroviruses. *J. General Virol.* 80:2217-28.

QUAINOO, A.K.; WETTEN, A.C. ; ALLAINGUILLAUME, J. 2008. Transmission of Cacao swollen shoot virus by seeds. *J. Virol.Methods* 150: 45-9.

RICHERT-POGGELER, K.R.; SHEPERD, R.J. Petunia vein clearing virus: a plant pararetrovirus with the core sequences for an integrase function. *Virology*, v. 236, n. 1, p.137-146, 1997.

RIDESA (2010) Rede Interuniversitária para o Desenvolvimento do Setor Sucroalcooleiro. Catálogo nacional de variedades “RB” de cana-de-açúcar. Curitiba, 2010. 136 p.

RIVAS, E.B.; DUARTE, L.M.L.; CHAGAS, C.M. ; ALEXANDRE, M.A.V. 1993. Observação de partículas do tipo badnavirus em *Yucca elephantipes*. *Fitopatol. Bras.*18:291.

RIVAS, E.B.; DUARTE, L.M.L.; ALEXANDRE, M.A.V.; FERNANDES, F.M.C.; HARAKAVA, R.; CHAGAS, C.M. 2005. A new Badnavirus species detected in *Bougainvillea* in Brazil. *J. Gen. Plant Path.* 71:438-40.

RODRIGUEZ-LEMA, E.; RODRIGUEZ, D.; FERNANDEZ, E.; ACEVEDO, R. ; LOPEZ, D. 1985. Reporte de un nuevo vírus de la cana de azucar. *Ciencias de la Agricultura* 23:130.

SCHENK, P. M.; REMANS, T.; SÁGI, L.; ELLIOTT, A. R.; DIETZGEN, R. G.; SWENNEN, R.; EBERT, P.; GROF, C. P. L. ; MANNERS, J. M. 2001. Promoters for pregenomic RNA of banana streak badnavirus are active for transgene expression in monocot and dicot plants. *Plant Mol. Biol.* 47:399-412.

STAVOLONE, L.; HERZOG, E.; LECLERC, D. ; HOHN, T. 2001. Tetramerization is a conserved feature of the virion-associated protein in plant pararetroviruses. *J. Virology* 75:7739–43.

TZAFRIR, I.; AYALA-NAVARRETE, L.; LOCKHART, B. E. L. ; OLSZEWSKI, N. E. 1997. The N-terminal portion of the 216-kDa polyprotein of *Commelina* yellow mottle badnavirus is required for virus movement but not for replication. *Virology* 232:359-68.

VEGA, J. ; SORDI, R. 1991. Virus baciliforme em cana-de-açúcar detectado no Brasil através de microscopia eletrônica de imunoabsorção. *Fitopatol. Bras* 16:XXVI.

VISWANATHAN, R., ALEXANDER, K. C., GARG, I. D., 1996. Detection of sugarcane bacilliform virus in sugarcane germplasm. *Acta Virol.*40(1),5–8.

YAMASHITA, S.; FERREIRA, P.T.O. ; FIGUEIREDO, D.V.; BRIOSO, P.S.T. ; KITAJIMA, E.W. 2003. Occurrence of a badnavirus in *Bougainvillea* in Brazil. *Summa Phytopathol.* 29:216-7.

YAMASHITA, S.; FERREIRA, P.T.O. ; KITAJIMA, E.W. 2004. A undescribed badnavirus found from *Bougainvillea glabra* in Brazil. Japan. J. Plant Path. 70:260-1.

YAMASHITA, S.; FERREIRA, P.T.O.; FIGUEIREDO, D.V.; BRIOSO, P.S.T.; KITAJIMA, E.W. 2004. Occurrence of a badnavirus in *Bougainvillea* in Brazil. Summa Phytopathol. 30:68.

7. ANEXO

Tabela 5. Genótipos provenientes do Banco de Germoplasma de cana-de-açúcar da Serra do Ouro testados para a presença de Badnavirus pela técnica de PCR.

Amostras	Genótipos	PCR (+/-)	Amostras	Genótipos	PCR (+/-)
1	RB956911	–	101	PO12878	+
2	RB951560	–	102	PHIL54-60	+
3	RB955964	–	103	NCO339	–
4	RB951557	–	104	NCO310	–
5	RB925268	+	105	NCO292	–
6	RB92579	+	106	NA63-90	–
7	RB918744	+	107	NA56-31	–
8	RB918639	–	108	N21	–
9	RB918590	–	109	MEX68- 200	+
10	RB918577	–	110	MER60-12	–
11	RB915079	+	111	LCP81-10	–
12	RB867515	+	112	L65-69	–
13	RB863129	–	113	JA64-20	–
14	RB80457	–	114	RB751194	–
15	Q134	+	115	RB758540	–
16	Q75	+	116	RB751194	–
17	PR69-2169	+	117	RB75126	+
18	PR62-66	+	118	RB739359	–
19	POJ3150	+	119	RB745464	+
20	L70-65	–	120	RB735275	–
21	H70-5040	–	121	RB735220	+
22	H70-2665	+	122	RB70141	+
23	H70-936	+	123	RB72454	+
24	H70-143	–	124	Q136	+

25	H70-2329	–	125	Q135	–
26	H69-8370	+	126	Q116	–
27	H69-7861	–	127	Q120	–
28	B59163	–	128	PR69-3141	–
29	H69-5100	+	129	Q86	–
30	RB99395	+	130	RB845197	–
31	RB988137	–	131	RB842784	–
32	RB99702	–	132	RB842789	–
33	RB99706	–	133	RB835089	–
34	RB935744	–	134	RB835054	+
35	H67-6724	–	135	RB83594	–
36	RB966925	+	136	RB83160	+
37	H66-2857	–	137	RB83102	+
38	H64-5996	–	138	RB825317	+
39	H57-5174	–	139	RB815606	+
40	H63-4644	–	140	RB815521	+
41	H59-9018	–	141	RB806043	–
42	H64-4499	+	142	RB802888	+
43	H66-2097	–	143	RB8060	–
44	H66-4927	–	144	RB855113	–
45	H67-6724	–	145	RB855536	–
46	B5141-4	–	146	RB855036	–
47	RB988113	–	147	RB845257	–
48	H68-93	–	148	RB845222	+
49	RB988101	–	149	RB845210	+
50	B51414	+	150	RB845197	–
51	RB97323	–	151	CP51-22	–
52	RB971703	–	152	NCO292	+
53	RB971755	+	153	CP51-22	–
54	RB971765	–	154	CO419	–

55	RB975198	–	155	CP48-103	–
56	RB976931	–	156	CO997	+
57	RB977508	–	157	CO6806	–
58	RB977535	–	158	CO285	+
59	RB977619	–	159	CP27-139	+
60	RB977612	–	160	CP29-116	+
61	RB977617	–	161	CB53-98	+
62	RB977662	–	162	CL47-83	+
63	RB977625	–	163	B59136	+
64	RB977666	–	164	BJ7015	–
65	RB98706	+	165	BJ7504	–
66	RB98709	–	166	B42231	–
67	RB98710	–	167	B70710	–
68	RB98708	+	168	B49119	–
69	RB98710	–	169	BR7904	–
70	RB981805	+	170	CB45-3	–
71	RB981806	+	171	CB45-155	–
72	RB987545	+	172	CO281	–
73	RB981809	+	173	CB56-20	+
74	RB987579	–	174	BH10/12	+
75	RB987580	–	175	BO17	+
76	RB987731	+	176	BJ7452	+
77	RB987905	+	177	CO62175	+
78	RB987915	+	178	CO453	–
79	RB987933	–	179	CO453	+
80	RB987932	+	180	CO775	+
81	RB987935	–	181	IN84-58	+
82	RB987956	–	182	RB768647	–
83	RB987965	–	183	RB862615	–
84	RB987983	–	184	RB931602	–

85	RB987970	–	185	RB935907	–
86	RB988067	+	186	RB946900	–
87	RB988082	–	187	RB936010	–
88	RB988101	–	188	RB938702	–
89	RB9866419	–	189	RB931566	+
90	RB9771649	+	190	RB865230	+
91	RB979539	–	191	RB867515	+
92	RB988137	+	192	RB872552	–
93	RB99371	–	193	RB931565	–
94	RB99381	–	194	RB931555	–
95	RB99396	–	195	RB862821	+
96	RB99400	–	196	IAC52/179	+
97	RB99710	–	197	COS245	+
98	RB991508	–	198	CO331	+
99	RB991512	–	199	CO434	+
100	RB979341	–	200	CB36-24	–

*RB = República do Brasil, Q = Queensland, Austrália, PR = Porto Rico, PJ e POJ = Proefstation Oost Java = Java, Indonésia, H = Havai, EUA, PO = Usina Barra – SP, desenvolvida na Serra do Ouro, PHIL = Filipinas, Mex = México, L = Louisiana/Canal Point, EUA, B = Barbados, NCO = África do Sul, NA = Norte da Argentina, N = África do Sul, LCP Louisiana/Canal Point, EUA, CP = Canal Point, EUA, CO = Coimbatore, Índia, BJ = Barbados, CB = Campos, Brasil.