



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
CAMPUS DE ENGENHARIAS E CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM PROTEÇÃO DE PLANTAS



MARIA HELLOÁ COSTA DE OLIVEIRA

**INCIDÊNCIA E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE BADNAVÍRUS EM
TROPICAIS NO ESTADO DE ALAGOAS**

Rio Largo

2023

MARIA HELLOÁ COSTA DE OLIVEIRA

**INCIDÊNCIA E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE BADNAVÍRUS EM
FLORES TROPICAIS NO ESTADO DE ALAGOAS**

Tese apresentada à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Proteção de Plantas da Universidade Federal de Alagoas como requisito para o título de Doutor(a) em Proteção de Plantas.

Orientadora: Profa. Dra. Sarah Jacqueline Cavalcanti da Silva.

Rio Largo

2023

Catálogo na Fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Campus de Engenharias e Ciências Agrárias
Bibliotecário Responsável: Erisson Rodrigues de Santana - CRB4 - 1512

O48i Oliveira, Maria Helloá Costa de.

Incidência e caracterização molecular de badnavírus em tropicais no estado de Alagoas. / Maria Helloá Costa de Oliveira. – 2023.

60f.: il.

Orientadora: Sarah Jacqueline Cavalcanti da Silva.

Tese (Doutorado em Proteção de plantas) – Programa de Pós -Graduação em Proteção de plantas, Campus de Engenharias e Ciências Agrárias, Universidade Federal de Alagoas. Rio Largo, 2023.

Inclui bibliografia

1. *Caulimoviridae*. 2. *Zingiberales*. 3. High-throughput sequencing.
I. Título.

CDU: 631.523

MARIA HELLOÁ COSTA DE OLIVEIRA

INCIDÊNCIA E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE BADNAVÍRUS EM
FLORES TROPICAIS NO ESTADO DE ALAGOAS

Tese submetida ao corpo docente do Programa de
Pós-Graduação em Proteção de Plantas da
Universidade Federal de Alagoas e **Aprovada** no
dia 31 de julho de 2023.



Documento assinado digitalmente

SARAH JACQUELINE CAVALCANTI DA SILVA

Data: 28/10/2023 19:09:23-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dra. Sarah Jacqueline Cavalcanti Da Silva (CECA/UFAL)
(Orientadora e Presidente Titular)

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Gaus Silvestre De Andrade Lima (CECA/UFAL)

Prof. Dr. Gildemberg Amorim Leal Junior (CECA/UFAL)



Documento assinado digitalmente

JOAO MANOEL DA SILVA

Data: 27/10/2023 18:34:36-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. João Manoel Da Silva (UESPI)

Documento assinado digitalmente



MAYRA MACHADO DE MEDEIROS FERRO

Data: 27/10/2023 22:17:15-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Dra. Mayra Machado De Medeiros Ferro

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus pela minha vida, saúde e pelo dom de ser mãe. A Nossa Senhora por sempre estar latente em meu coração, mesmo nos momentos mais difíceis e nas perdas irreparáveis. A minha querida, doce e alegre Bettina por ser meu combustível diário de amor, esperança e coragem. Ao meu esposo Antônio Carlos por todo companheirismo, amor, paciência e suporte a mim sempre dedicados.

Aos meus pais, José Cleber de Oliveira (*in memoriam*) e Marleide Costa de Oliveira, por todo amor, carinho e dedicação.

As minhas irmãs, Ytalla Costa e Ágatha Costa por partilharem comigo essa jornada chamada vida, e por terem me presenteado com sobrinhos maravilhosos.

À minha Orientadora, Sarah Jacqueline Cavalcanti por ter aceitado a orientação, por todo suporte, ensinamento, apoio e pela amizade construída ao longo dos anos.

Ao Prof. Dr. Gaus Silvestre e Prof. Dra. Iraildes Assunção, pela confiança, apoio, suporte e conselhos ao longo de toda minha trajetória acadêmica, presentes desde a graduação.

Aos meus colegas de laboratório pela convivência e partilha, contribuindo de alguma forma no meu crescimento pessoal e profissional, em especial Dr. Mariotte Santos Neto pelo apoio, preocupação e troca em tempos difíceis. A Dra. Mayra Ferro, por todo suporte, ensinamento e paciência ao longo de todos esses anos, sendo peça fundamental neste trabalho;

Ao Programa de Pós Graduação em Proteção de Plantas e a Universidade Federal de Alagoas (UFAL).

Aos meus professores do Ensino Fundamental, Médio, Graduação, Mestrado e Doutorado. Cada um com sua contribuição, de seu jeito, todos fundamentais para minha formação pessoal e acadêmica.

Aos profissionais da saúde que atuaram de forma maestral durante o período de pandemia COVID-19.

RESUMO

Um dos segmentos mais promissores do agronegócio nacional é a floricultura, com um mercado emergente de lucratividade em todo o mundo. As flores tropicais são atacadas por diferentes patógenos, dentre eles as badnavirose. Os badnavírus (Família *Caulimoviridae*) consistem em um grupo de vírus com genoma de DNA circular fita dupla, encapsidados em partículas baciliformes não envelopados e transmitidos principalmente por cochonilhas. Doenças causadas por vírus deste gênero têm emergido como sérios problemas para muitas culturas economicamente importantes nas regiões tropicais e subtropicais do mundo, incluindo o Brasil. Para determinação da incidência de espécies de badnavírus que ocorrem em plantas tropicais das famílias Costaceae, Heliconiaceae e Zingiberaceae amostras foram coletadas nos polos produtores de plantas tropicais em Alagoas. Submetidas a detecção de badnavírus, via PCR (“*Polymerase Chain Reaction*”) usando os primers universais para o gênero. Quatorze amostras *Costus spiralis* (8), *Alpinia purpurata* (4) e *Heliconia sp.* (2) foram positivas, posteriormente essas amostras foram submetidos à amplificação do genoma viral completo via *Rolling circle amplification* (RCA) utilizando o kit Templiphi™ 100 amplification (GE Healthcare Life Sciences) e novamente submetidas a PCR para detectar a ocorrência de infecção por badnavírus na forma episomal. Identificadas a amostra infectada com o vírus na forma episomal, o produto de RCA foi enviado para Sequenciamento de Alto Rendimento (high-throughput sequencing). A sequência do genoma viral completo foi montada e submetida à análise BLASTn, análise de comparações pareadas no programa SDT para demarcação de espécies, e RPD para identificação de eventos de recombinação. Um novo isolado de *Badnavirus alphavirgamusae* (BSGFV) foi identificado, neste trabalho referido como BSGFV_BR_ALPINIA.

Palavras-chave: *Caulimoviridae*, *Zingiberales*, high-throughput sequencing.

ABSTRACT

One of the most promising segments of national agribusiness is floriculture, with an emerging profitable market all over the world. Tropical flowers are attacked by different pathogens, including badnaviruses. Badnaviruses (Family *Caulimoviridae*) consist of a group of viruses with a double-stranded circular DNA genome, encapsidated in non-enveloped bacilliform particles and transmitted mainly by mealybugs. Diseases caused by viruses of this genus have emerged as serious problems for many important economic crops in the tropical and subtropical regions of the world, including Brazil. For the influence of the incidence of badnavirus species that occur in tropical plants of the Costaceae, Heliconiaceae and Zingiberaceae families, the sample was collected in the poles producing tropical plants in Alagoas. Subjected to detection of badnavirus, via PCR (“Polymerase Chain Reaction”) using universal primers for the genus. Fourteen sample *Costus spiralis* (8), *Alpinia purpurata* (4) and *Helicônia sp.*(2) were positive, later the analyzes were confirmed to the amplification of the complete viral genome via Rolling circle amplification (RCA) using the Templiphi™ 100 amplification kit (GE Healthcare Life Sciences) and again we continued PCR to detect the occurrence of badnavirus infection in the episomal form. After identifying a sample infected with the virus in the episomal form, the RCA product was sent for high-throughput sequencing. The complete viral genome sequence was collected and observed by BLASTn analysis, pairwise analysis in the SDT program for species demarcation, and RPD for identification of recombination events. A new isolate of *Badnavirus alphavirgamusae* (BSGFV) was identified, in this work referred to as BSGFV_BR_ALPINIA.

Keywords: *Caulimoviridae*, *Zingiberales*, high-throughput sequencing.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Representação esquemática da organização genômica de um badnavírus	18
Capítulo I	
Figura 2: Amostras foliares com sintomas característicos de infecção por badnavírus.....	36
Figura 3: Amostras foliares com sintomas característicos de infecção por badnavírus.....	36
Capítulo II	
Figura 1: Sintomas de estrias cloróticas em alpinia purpurata característico de infecção por mosaico amarelo caudados por <i>Badnavirus alphavirgamusae</i> (BSGFV)	55
Figura 2. Matriz SDT de análise por comparação pareada do genoma completo.	56
Figura 3. Matriz SDT de análise de comparação pareada da região RT.....	56
Figura 4. Análise filogenética de inferência Bayesiana baseada no genoma completo do isolado BSFGV_BR_AR e isolados do NCBI-GenBank	57
Figura 5. Análise filogenética de inferência Bayesiana baseada na região RT do isolado BSFGV_BR_AR e de outros isolado do NCBI-GenBank.	58

LISTA DE TABELAS

Capítulo I

Tabela 1: Quantidade de amostras coletas por espécie, número de amostras positivas para PCR, RCA e PCR episomal 36

Capítulo II

Tabela 1: Lista das sequencias de badnavírus baixadas no NCBI-GenBank..... 59

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	11
1. REFERENCIAL TEÓRICO	13
2.1 Produção de flores tropicais.....	13
2.2 Cultivo de flores tropicais no Brasil	14
2.3 Família <i>Caulimoviridae</i>.....	16
2.4 Gênero <i>Badnavirus</i>.....	17
Referências.....	20
3. Capítulo I - Incidência de badnavírus infectando flores tropicais no estado de Alagoas	26
3.1 Introdução.....	28
3.2 Material e Métodos	30
3.2.1 Obtenção do Material Vegetal.....	31
3.2.2 Detecção de badnavírus via PCR do DNA total	31
3.2.3 Rolling Circle Amplification (RCA).....	31
3.3.3. Resultados e Discussão	32
4. Capítulo II - Detecção episomal e sequenciamento do genoma completo de Banana Streak GF virus em <i>Alpinia purpurata</i> no Brasil	43

1. INTRODUÇÃO

A floricultura é um mercado dinâmico e diverso, que envolve a produção de flores e plantas ornamentais como: flores de corte, envasadas, folhagens, mudas de jardim e plantas de interior, até a produção de bulbos, tubérculos, rizomas, estacas e sementes, em vários setores, como: de insumos, embalagens, mudas e substratos, além do mercado de varejo e atacado (BRAINER, 2019). Este setor abrange importante papel no âmbito social, ecológico e econômico. Social pela utilização de pequenas áreas, podendo ser uma alternativa para pequenos produtores, ecológico, pelo seu sistema de produção permitir a preservação e o convívio com espécies nativas, e econômico pela sua alta rentabilidade e rápido retorno financeiro (TERRA; ZUGE, 2013; BRAINER, 2019), comparada a fruticultura, a floricultura pode gerar rendimento até dez vezes superior (ALMEIDA, 2004), contribuindo para a permanência de agricultores no campo (DUVAL, 2014). As peculiaridades e características das flores tropicais como: beleza rara, cores, formatos variados, durabilidade pós-colheita, rusticidade e boa adaptação a climas quentes, vem atraindo e agradando diversos mercados consumidores e produtores de pequeno e grande porte (LUZ et al., 2003; LAMAS, 2004; LOGES et al., 2005; SENAR, 2016).

O mercado brasileiro de flores registrou em 2018 um aumento de 10%, movimentando R\$ 8,1 bilhões (GIMENEZ et al., 2020). Essa atividade de produção é benéfica para a geração de renda, sendo desenvolvida principalmente por agricultores familiares, com a geração de mais de 200 mil empregos diretos, e área plantada de aproximadamente 15 mil hectares no país (ALENCAR; GALERA, 2016). A região Nordeste ocupa a terceira posição nacional em número de estabelecimentos com produção de flores e plantas ornamentais, com destaque para os estados da Ceará, Bahia e Pernambuco. Alagoas, conta com 1,6% desses estabelecimentos, ocupando a sexta posição no cenário regional. Mais da metade destes estabelecimentos são destinados a produção de flores e folhagens para corte. A ordem Zingiberales engloba as espécies de flores tropicais de corte mais cultivadas no Brasil, incluindo *Alpinia purpurata*, *Costus spiralis*, *Etiligera* spp. (bastão-do-imperador), *Heliconia* spp., *Tapeinochilos ananassae*, *Zingiber spectabile* (gengibre sorvetão) (SENAR, 2016; BRAINER, 2019). As flores tropicais são acometidas por diversos problemas fitossanitários, em especial as viroses que causam sintomas em folhas e flores prejudicando sua produção e comercialização (LINS et al., 2004; ZHANG et al., 2017; ALEXANDRE et al., 2023). Vírus pertencentes as famílias *Bromoviridae*, *Caulimoviridae*, *Potyviridae* e *Rhabdoviridae* foram relatados infectando flores tropicais que pertencem a ordem Zingiberales (FREIRE et al., 2009; GREEN, et al., 2018; LI et al., 2019).

O gênero *Badnavirus* engloba pararetrovírus que possuem genoma de dsDNA semicircular de 7,2- 9,2 kpb, encapsidados em partículas baciliformes não envelopadas (GEERING; HULL, 2012, TEYCHENEY et al, 2020). O genoma viral típico apresenta descontinuidades sítio específicas em cada fita e abriga três ORFs, nomeadas I, II e III TEYCHENEY et al, 2020). As ORFs I e II codificam respectivamente proteínas associadas ao vírion (CHENG; LOCKHART; OLSZEWSKI, 1996) e de ligação de ácido nucleico (JACQUOT et al., 1996). A ORF III codifica para uma poliproteína, que gera as proteínas de movimento (MP), da capa proteica (CP), a aspartato protease (AP), a transcriptase reversa (RT) e a ribonuclease H (RNaseH) (HARPER; HULL, 1998; MEDBERRY; LOCKHART; OLSZEWSKI, 1990,

TEYCHENEY et al, 2020). Atualmente, três espécies de badnavírus reconhecidas pelo *International Committee on Taxonomy of Viruses* (ICTV, talk.ictvonline.org), *Badnavirus alphavirgamusae* (banana streak GF virus - BSGFV), *Badnavirus alphamaculaflavicannae* (canna yellow mottle associated virus – CaYMaV-Ci) e *Badnavirus betamaculaflavicannae* (canna yellow mottle virus – CaYMV), foram descritas infectando espécies de Zingiberales como *Alpinia purpurata*, *Canna* spp. e *Heliconia* spp.(CARDONA e ZAPATA, 2012; ZHANG et al., 2017; GREEN et al., 2018; WIJAYASEKARA et al., 2018). Badnavírus associados a flores tropicais são naturalmente transmitidos por diferentes espécies de cochonilhas, causando sintomas que incluem manchas amarelas, necrose foliar, estrias e nanismo (ZHANG et al., 2017; GREEN et al., 2018; WIJAYASEKARA et al., 2018). Badnavírus representam uma ameaça significativa a produtividade e movimento de germoplasma de flores tropicais, uma vez que estas são propagadas exclusivamente de forma vegetativa que propicia o acúmulo e disseminação viral para outras espécies cultivadas.

Desta forma, algumas espécies de flores tropicais se tornam veículo de disseminação de doenças para outras espécies cultivadas (GASPAROTTO et al. 2005) como, por exemplo, a cultura da banana, que detém grande importância econômica para Alagoas (IBGE, 2017). Com isto, este trabalho teve como objetivo determinar a incidência e caracterização molecular de badnavírus em flores tropicais no estado de Alagoas.

1. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Produção de flores tropicais

2.2 Cultivo de flores tropicais no Brasil

A região Nordeste é considerada a principal produtora de plantas tropicais do país, contribuindo com o desenvolvimento socioeconômico (ALMEIDA et al., 2012). Espécies vegetais como alpinia, helicônia, *Canna*, bastão do imperador, antúrio, gengibre ornamental (sorvetão), *Musa* e *Costus* são as mais cultivadas no país (LAMAS, 2004). Flores tropicais pertencem às famílias Heliconiaceae, Musaceae e Zingiberaceae se desenvolvem naturalmente ou são exploradas em plantios convencionais na faixa tropical da América, Ásia e Pacífico Oeste (ASSIS et al, 2002).

São plantas herbáceas, rizomatosas, perenes de reduzido porte ou arborescentes, caracterizadas por suas brácteas de cores e formas variadas, maior durabilidade pós-colheita, de grande beleza, utilizadas para ornamentação de ambientes (REFERÊNCIA). Para cultivo de plantas ornamentais tropicais é necessário planejamento, fazer a escolha das espécies a serem cultivadas, para definir a área de cultivo, o sistema que deve ser empregado e técnicas se alcançar maior expressividade de produção. A maioria das espécies de plantas ornamentais tropicais são produzidas em canteiros para facilitar o o manejo e organizar o sistema produtivo (AREND, 2019).

A helicônia é origináriada América do Sul e Central, pertencente a família Heliconiaceae e ao gênero *Heliconia* (ANDERSSON, 1989; MOSCA et al., 2005). São identificadas cerca de 250 espécies (MOSCA et al., 2005), com 40 de ocorrência natural no país (BARREIROS,1970; SANTOS, 1978). Mesmo com grande diversidade de espécies nativas, apenas uma pequena parcela é comercializada como flor de corte. A maior produção se concentra nas espécies *H. bihai*, *H. psittacorum*, *H. wagneriana*, *H. rostrata*, *H. stricta* (CASTRO; MAY; GONÇALVES, 2007). De porte herbáceo, com diferentes tamanhos, podendo alcançar até 12 m de altura, propagam-se por meio de rizomas subterrâneos, que emitem brotações à superfície, podendo ser solitários ou agregados; por micropropagação ou por sementes, dependendo da espécie. Cada planta é composta por pseudocaule, folhas e uma única inflorescência (MOSCAet al., 2005).

A alpinia (*Alpinia purpurata*), pertencente à família Zingiberaceae (CASTRO, 1995), originária da Ásia, norte da Austrália e Ilhas Salomão (LOGES et al., 2009) é conhecida popularmente como gengibre-vermelho, panamá e flor do México (WAGNER; HERBST; SOHMER, 1999). As espécies mais cultivadas são Red Ginger (vermelha), Pink Ginger (rosa), Jungle King (vermelha), Jungle Queen (rosa) e Eileen MacDonald (rosa) (LAMAS, 2004). As plantas são perenes, e chegam a quatro metros de altura formando touceiras. O caule é

subterrâneo do tipo rizoma, folhas lanceoladas, longas, espessas, bordas orladas e produzidas em talos densos de coloração verde escura. Suas inflorescências são terminais, compostas por brácteas eretas que chegam até 30 cm, podendo ter coloração vermelha à rosa, e esbranquiçadas (TERAO et al.,2005).

A família Costaceae compõe-se de quatro gêneros: *Costus*, *Monocostus*, *Dimerocostus* e *Tapeinochilos*, sendo o gênero *Costus* o mais numeroso, em torno de 125-175 espécies de distribuição Pantropical (DUARTE, 2017). A espécie *Costus spiralis*, conhecida popularmente como cana-do-brejo, é nativa do Brasil, com predominância nas regiões da mata atlântica e amazônica (SIGNORI; CORREA, 2015). A cana-do-brejo é caracterizada como uma planta perene, ereta, rizomatosa, cespitosa, não ramificada, que pode atingir entre 50 cm a 2m de altura. Suas folhas são dotadas da coloração verde, alternadas, membranáceas, as quais se beneficiam também por conter bainhas papiráceas, com tecido de seda nas duas faces, dispostas em espiral no caule podendo atingir de 25 a 40 centímetros de comprimento e de 6 a 10 centímetros de largura (PEDROSA, 2017). Sob o aspecto morfológico, dispõe de estruturas foliáceas associadas a inflorescências racemosas em forma de espiga; imbricadas; densa; glabro, apresentando brácteas vermelhas, fechadas e sobrepostas, as quais em seu interior se desenvolvem botões florais e frutos. As inflorescências compreendem cerca de 8cm comprimento com média de 40 flores, em cada bráctea. Suas flores exibem coloração vermelhas com ducto floral formado por três pétalas fundidas na base e não apresentam odor, seus frutos são capsulares e prolifera-se por sementes ou rizomas (DUARTE, 2017).

2.3 Família *Caulimoviridae*

A família *Caulimoviridae* engloba vírus de plantas que possuem o genoma constituído por uma molécula de DNA semicircular de fita dupla (dsDNA), com tamanho de 7,2 a 9,2 kbp (FAUQUET et al., 2005; GEERING; HULL, 2012), encapsulada em partículas não envelopadas de morfologia isométrica (50-52 nm de diâmetro) ou baciliforme (30 nm de largura e 130-150 nm de comprimento) (GEERING & HULL, 2012). Seu genoma possui geralmente uma região intergênica poli-A e descontinuidades de fita simples (ou gaps) em sítios específicos de ambas as fitas (HARPER et al., 2002).

Para a divisão dos gêneros pertencentes a esta família, são adotados critérios que incluem o tipo de inseto vetor, gama de hospedeiros, organização genômica e relacionamento filogenético. Com base nesses critérios, são reconhecidos pelo *International Committee on Taxonomy of Viruses* (ICTV) onze gêneros: *Badnavirus*, *Caulimovirus*, *Cavemovirus*, *Dioscavirus*, *Petuvirus*, *Rosadnavirus*, *Ruflodivirus*, *Solendovirus*, *Soymovirus*, *Tungrovirus* e *Vaccinivirus*. Membros dessa família são encontrados amplamente distribuídos geograficamente, sendo que a maioria das espécies dos gêneros *Tungrovirus*, *Badnavirus* e *Dioscavirus* se localizam nas regiões tropicais e subtropicais, os demais membros, são encontrados em regiões temperadas (GEERING & HULL, 2012; TEYCHENEY et al., 2020).

A transmissão das espécies dessa família pode ocorrer de forma natural, via inseto vetor (Ordem: Hemiptera – Famílias: Aleyrodidae, Aphididae, Cicadellidae e Pseudococcidae), contato entre plantas hospedeiras, sementes ou pólen e propagação vegetativa ou, também, por técnicas como a inoculação mecânica ou enxertia (FAUQUET et al., 2005). Os sintomas característicos associados aos caulimovírus são variados, dependendo da espécie viral, hospedeiro e condições climáticas. Clorose de nervuras, estrias, mosaico, manchas necróticas, linhas e manchas cloróticas, nanismo, enrolamento e má formação foliar e enrolamento de folíolos são os sintomas mais frequentes apresentados. Plantas Angiospermas (Monocotiledôneas e Eudicotiledôneas) constituem os hospedeiros naturais de espécies da família *Caulimoviridae* (GEERING & HULL, 2012).

Os membros da família *Caulimoviridae* são classificados como pararetrovírus, termo introduzido para definir vírus de plantas que replicam por transcriptase reversa (o genoma é diretamente transcrito em um RNA mensageiro, que é sintetizado a partir do genoma original e é transcrito novamente em DNA) e diferem dos retrovírus com base no seu genoma de DNA e na sua integração de forma passiva no genoma hospedeiro não sendo necessária codificar a enzima integrase para completar seu ciclo de replicação (TEMIN 1985; BHAT et al., 2016), o mecanismo ainda é pobremente compreendido.

Possuem sequências conhecidas como endógenas de pararetrovírus (*Endogenous Pararetroviral Sequences* - EPRVs) que são a classe mais abundante de sequências virais endógenas em diferentes espécies de plantas (GAYRAL; ISKRACARUANA, 2009). Grande parte das EPRVs de caulimovírus possuem um padrão de arranjo similar com repetições em tandem, duplicações internas, fragmentações e inversão do genoma viral, resultando em genomas virais parciais e não funcionais, porém várias integrações contêm toda extensão do genoma viral, com ORFs funcionais. (GAYRAL; ISKRA-CARUANA, 2009; TEYCHENEY; GEERING, 2011). Tais sequências podem então ser ativadas resultando na liberação do genoma viral funcional que infectará o hospedeiro (GAYRAL; ISKRA-CARUANA, 2009). Sequências endógenas da família *Caulimoviridae* foram descritas em 27 espécies de nove famílias de plantas e derivam dos gêneros *Caulimovirus*, *Petuvirus*, *Badnavirus*, *Solendovirus* e dos gêneros putativos *Orendovirus* e *Florendovirus* (TEYCHENEY; GEERING, 2011; MUSHEGIAN; ELENA, 2015; DIOP et al., 2017).

Existem evidências de que algumas sequências endógenas são capazes de iniciar a infecção em determinadas condições como resposta a estresses abióticos, como temperatura, água, nutrientes, cultura de tecidos, ferimentos, mudanças no comprimento do dia, enxertia e processos de reprodução, como cruzamentos (REFERÊNCIA). Podendo ser citado o *Badnavirus deltavirgamusae* (banana streak OL virus; BSOLV) (NDOWORA et al., 1999), *Badnavirus alphavirgamusae* (Banana streak GF virus; BSGFV) (GAYRAL; ISKRA-CARUANA, 2009), *Solendovirus venanicotianae* (Tobacco vein clearing virus; TVCV) (LOCKHART et al., 2000) e *Petuvirus venapetuniae* (Petunia vein clearing virus; PVCV) (STAGINNUS; RICHERT-PÖGGELER, 2006). A presença de sequências endógenas de badnavírus no genoma da hospedeira tem tornado um desafio à diagnose, taxonomia, movimento seguro de germoplasma e o controle das doenças causadas pelos badnavírus (BHAT et al., 2016).

2.4 Gênero *Badnavirus*

O gênero *Badnavirus* é o mais numeroso da família *Caulimoviridae*, com 69 espécies reconhecidas pelo ICTV (<https://talk.ictvonline.org/>). Sua nomenclatura foi originada do termo “bacilliform DNA virus” já que se caracteriza por apresentar partícula viral baciliforme não envelopada com aproximadamente 30nm largura x 130-150 nm de comprimento (GEERING; HULL, 2012). Seu genoma é composto por apenas um molécula de dsDNA, não covalentemente fechado, com 7,2 a 7,6 kbp (cada fita com uma única descontinuidade) (TEYCHENEY et al., 2020).

Os badnavírus possuem, de um modo geral, três principais ORFs (Open Reading Frames – Sequências de leitura aberta) e contém geralmente três descontinuidades (gaps) em sítios específicos (Figura 1), no entanto, o número de ORFs pode chegar a sete, como *Badnavirus reterubi* (Rubus yellow net virus, RYNV) (TEYCHENEY et al., 2020). A ORF I codifica uma proteína de 20,8 a 23 kDa (P1), que possui uma função ainda desconhecida, a ORF II, codifica uma proteína de 14,5 a 15 kDa (P2) que possui uma função associada à encapsidação do vírion (CHENG et al., 1996; JACQUOT et al., 1996; STAVOLONE et al., 2001). A ORF3 é bastante semelhante entre os badnavírus, sendo a maior ORF e codificando uma poliproteína de 208 a 216 kDa, que após ser clivada, gera proteínas de movimento, capa proteica, aspartil protease, transcriptase reversa (RT) e Ribonuclease H (RNAaseH) (BHAT et al., 2016; TEYCHENEY et al., 2020).

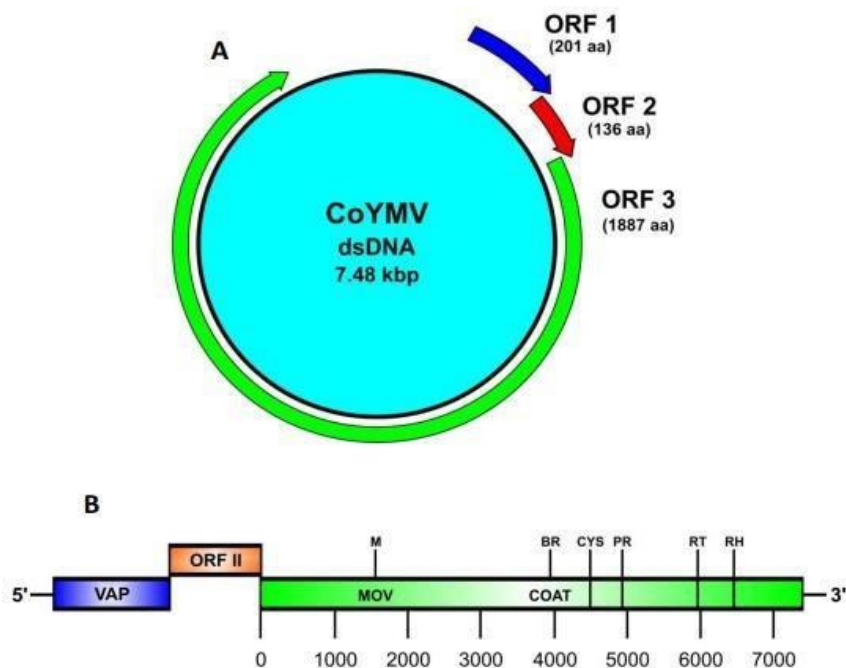


Figura 1. (A) Representação esquemática da organização genômica de um badnavírus típico, *Commelina yellow mottle virus* (CoYMV). O círculo completo representa o genoma de DNA de fita dupla. As setas largas indicam a posição das ORFs I, II e III. **(B)** Representação linear do mapa genômico de badnavírus mostrando a identificação dos domínios: domínios de movimento (M), motivo de ligação ao RNA (BR), região conservada de cisteína (CYS), aspartato protease (PR), transcriptase reversa (RT) e ribonuclease H (RH) (BRIDDON et al., 1999).

A demarcação de espécies de badnavírus é baseada na gama de espécies hospedeiras, especificidade do vetor e na determinação da sequência de nucleotídeos da região genômica que inclui os domínios Transcriptase reversa e RNAase H (RT/RNaseH), localizados na ORF III do genoma viral. O ICTV estabelece um limite padrão de > 80% de identidade de nucleotídeos na região RT/RNase H para demarcação de espécies deste gênero (GEERING & HULL, 2012). Vírus deste gênero são conhecidos por infectar plantas monocotiledôneas e dicotiledôneas, embora a maioria das espécies tenha uma gama de hospedeiro restrita. E tem emergido como sérios patógenos para muitas culturas tropicais, especialmente banana (*Musa* spp.) (LOCKHART; OLSZEWSKI, 1993), pimenta do reino (*Piper nigrum*) (Lockhart et al, 1997), cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*) (Karuppaiah et al., 2013), taro (*Colocasia esculenta*) (YANG et al., 2003) e inhame (*Dioscorea* spp.) (PHILLIPS et al., 1999). Os sintomas causados por infecção de badnavírus são variados e incluem mosqueado clorótico, estrias necróticas, avermelhamento das nervuras, inchamento dos ramos, deformação, redução do tamanho dos entrenós levando ao desenvolvimento de nanismo (BHAT et al., 2016).

A disseminação de badnavírus ocorre principalmente por propagação vegetativa e, em alguns casos, como o *Badnavirus maculacommelinae* (*Commelina yellow mottle virus*; CoYMV), *Badnavirus maculakalanchoes* (*kalanchoe top-spotting virus*; KTSV), *Badnavirus maculapiperis* (*Piper yellow mottle virus*; PYMoV), *Badnavirus etainflatheobromae* (*cacao swollen shoot Togo B virus* (CSSTBV) e *Badnavirus alphacolocalasiae* (*taro bacilliform virus*; TaBV) que podem também ser transmitidos por sementes (HEARON et al., 1984; QUAINO et al., 2008; HAREESH; BHAT, 2010; DEESHMA et al., 2014; BHAT et al., 2016.). A transmissão horizontal de badnavírus ocorre através de várias espécies de cochonilha, enquanto as espécies *Badnavirus venaribis* (*gooseberry vein banding associated virus*; GVBaV), *Badnavirus reterubi* (*rubus yellow net virus*; RYNV) e *Badnavirus maculaspiraeae* (*Spiraea yellow leaf spot virus* (SYLSV) são transmitidas por afídeos (BHAT et al., 2016).

No Brasil, infecções causadas por badnavírus já foram descritas em abacaxi (SILVA et al., 2015; Santos et al., 2020), bananeira (BRIOSO et al., 2012), *Bougainvillea* (RIVAS et al., 2005); inhame (LIMA et al., 2013), cana-de-açúcar (SILVA et al., 2015; SANTOS et al., 2022), cacau (Ramos-Sobrinho et al., 2021) e cará-moela (Santos et al., 2022). Estudos realizados com as culturas de abacaxi, inhame e cana-de-açúcar, em Alagoas, e outros estados do Nordeste do

país, revelaram que a incidência e variabilidade de badnavírus nessa região é elevada (LIMA et al., 2013; SANTOS et al., 2020; SILVA et al., 2015).

2.4 Referências

- AKI, A PEROSA; J.M.Y. Aspectos da produção e consumo de flores e plantas ornamentais no Brasil. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, Campinas, v.8, n.1/2, p.13-23, 2002.
- ALENCAR, B. de; GALERA V. **Mercado de flores atinge faturamento esperado para este ano** 2016.Disponível em: <http://revistagloborural.globo.com/Noticias/Agricultura/noticia/2016/06/mercado-deflores-atenge-expectativa-de-faturamento-para-o-ano.html> Acesso em: 16 de Julho de 2019.
- ALMEIDA, E. F. A., et al. **Flores Tropicais em Minas Gerais**. Circular Técnica, n. 176,p. 1–5, novembro, 2012.
- ALMEIDA, J. B. S. A Agricultura Familiar: Projeto Flores. Irriga Ceará 2004: Encontro Estadual do Agronegócio Cearense -Secretaria de Agricultura e Pecuária do Estado do Ceará, Fortaleza. 2004.
- ANDERSSON, L. Na evolutionary scenario for the genus *Heliconia*. In: HOLMNIELSON, I.C.; BALSLEV, H. (eds.).**Tropical forest; botanical dynamics, speciation and diversity**. London: Academic Press Limited. 173-184, 1989.
- AREND, E. B. **Produção de plantas ornamentais**. 2019.
- BARREIROS, H. S. **Notas sobre Heliconia linneana Lane** In: **HERB. Revista Brasileira de Biologia**, São Carlos, v.30, n.4, p.571-537, 1970.
- BHAT AI, HOHN T, SELVARAJAN R. **Badnaviruses: The Current Global Scenario**. Viruses, 2016.
- 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.
- CASTRO, A. C. R. et al. Teores e macronutrientes de rizomas de *Heliconia psittacorum* cv. Golden Torch submetidas a estresse nutricional, Recife, 2005.
- CASTRO, C. E. F. **Heliconia para exportação: Aspectos Técnicos da Produção**. Brasília, 1995. MAARA-SDR- FRUPEX/ISPI. (FRUPEX. Publicações Técnicas, 16).

CASTRO, C. E. F.; MAY A.; GONÇALVES C. **Espécies de helicônia como flores de corte. Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, v.12, n. 2, p. 87-96, 2007.

CHENG, C.; LOCKHART, B. E. L; OLSZEWSKI, N. E. The ORF I and II proteins of Commelina yellow mottle virus are virion-associated. **Virology**. v. 223, n. 2, p. 263-71, 1996.

DIOP, S.; GEERING A. D. W.; ALFAMA-DEPAUW, F.; MIKAEL LOAEC, F. F.; TEYCHENEY, P. Y.; MAUMUS, F. **Tracheophyte genomes keep track of the deep evolution of the Caulimoviridae**, doi: <https://doi.org/10.1101/158972>, 2017..

DUVAL, C. M. A produção de Flores e a Agricultura Familiar. *Revista Brasileira de Horticultura Ornamental*, v. 32, n. 2, 2014.

FAUQUET, C. et al. **Virus taxonomy**. Eight Report of the International committee on Taxonomy of Viruses. Amsterdam. Elsevier. 2005.

GAYRAL, P.; ISKRA-CARUANA, M. Phylogeny of Banana Streak Virus Reveals Recent and Repetitive Endogenization in the Genome of Its Banana Host (*Musa* sp.). **Journal of Molecular Evolution**. v. 69, p. 65-80, 2009.

GEERING, A. D. W.; HULL, R. Family Caulimoviridae. In: KING A.M.Q.; ADAMS M.J.; CARSTENS E.B.; LEFKOWITZ, E.J. **Virus Taxonomy. 9th Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses**. London UK. Elsevier Academic Press, p. 429-443, 2012.

GIMENEZ, Fernando Antonio Prado et al. *Revista Livre de Sustentabilidade e Empreendedorismo*. 2020.

HARPER, G. et al. **Viral sequences integrated into plant genomes**. *Annual Review of Phytopathology*, v. 40, p.119-136, 2002.

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

IBGE – INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Censo Agro 2017. Disponível em:

https://censoagro2017.ibge.gov.br/templates/censo_agro/resultadosagro/agricultura.html?localidade=27&tema=76237. Acessado em 29 de janeiro de 2023.

ICTV-International Committee on Taxonomy of Virus. Disponível em: <<https://talk.ictvonline.org/>>. Acessado em 25 de abril de 2023.

INSTITUTO BRASILEIRO DE FLORICULTURA - **IBRAFLOR**. **Mercado Interno 12.2014. Holambra, SP: IBRAFLOR, 2015.** Disponível em: http://www.ibraflor.com/ns_mer_interno.php. Acesso em: maio de 2022.

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

JUNQUEIRA, A. H.; PEETZ, M. S. **O setor produtivo de flores e plantas ornamentais do Brasil, no período de 2008 a 2013: atualizações, balanços e perspectivas.** Revista Brasileira de Horticultura Ornamental, v. 20, n. 2, p. 115–120, 2014.

LAMAS, A.M. Floricultura tropical: técnicas de produção. 2004, 14p.

LOCKHART, B. E. L. et al. Identification of Piper yellow mottle virus, a mealybug transmitted badnavirus infecting Piper spp. Southeast Asia. **European of Plant Pathology**, v. 103, p.303-311, 1997.

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.

LOGES, et al. Colheita, pós-colheita e embalagem de flores tropicais em Pernambuco. Horticultura Brasileira, v.23, n.3, p.699-702, 2005.

LOGES, V. et al. **Florescimento de variedades de Alpínia pupurata em Pernambuco. Magistra, Cruz das Almas – BA, v. 21, n. 4, p. 300-304, out./dez., 2009.**

LUZ, P. B et al. Cultivo de flores tropicais. 2003. 22 f. – Dissertação (Mestrando em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais, 2003.

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, n. 18, p.5505, 1990.

MIGLIORI, A. ; LASTRA, R. Study of viruses on Commelina diffusa Burm. in Guadeloupe. **Annales de Phytopathologie**. v. 10, 4, p, 467-77, 1978.

MOSCA, J.L., CAVALCANTE, R.A. Zingibereaceae. IN: TERAPO, D.; CARVALHO, A. C.P.P.de.; BARROSO, T.C. da S.F. (eds.) **Flores tropicais. Brasília :Embrapa Informações Tecnológicas: 2005. 225p.**

MUSHEGIAN, A. R.; ELENA, S. F. Evolution of plant virus movement proteins from the 30K superfamily and of their homologs integrated in plant genomes. **Virology**. v. 476, p. 304- 315, 2015.

OLIVEIRA FILHO, S. F. S. et al. Adoção de estratégias para redução de riscos: identificação dos determinantes da diversificação produtiva no Polo Petrolina Juazeiro. **Revista Economia e Sociologia Rural**. v.52, n.1, p.117-138, 2014.

PHILLIPS, S. et al. The Partial Characterization of a Badnavirus Infecting the Greater Asiatic or Water Yam (*Dioscorea alata*). **Journal of Phytopathology**. v. 147, p. 265-269, 1999.

SANTOS, E. **Revisão das espécies de gênero *Heliconia* L. (Musaceae) exotâneas na região fluminense.** Rodriguésia, Rio de Janeiro, v. 45, p. 99-221,1978.

SERVIÇO BRASILEIRO DE APOIO ÀS MICRO E PEQUENAS EMPRESAS - SEBRAE. **Flores e plantas ornamentais do Brasil: volume 1 - o mercado brasileiro de flores e plantas 51 ornamentais.** Brasília, DF: SEBRAE, 2015. Acesso em: Junho de 2023.

SILVA, J. M.; JORDÃO, L. J.; RAMOS-SOBRINHO, R.; LIMA, J. S.; ASSUNÇÃO, I. P.; CRUZ, M. M.; LIMA, G. S. A. Incidence and species diversity of badnaviruses infecting sugarcane from a germplasm collection in Brazil. **Tropical Plant Pathology**. v. 40, n. 3, p. 212-217, 2015.

SILVA, J.S.; OLIVEIRA, R.C.; DINIZ, S.P.S.S. Óleo essencial de *Mentha arvensis* L. como agente no controle de fungos fitopatógenos. **Pesq.agropec. pernamb.**, Recife, v. 17, n. único, p. 99-100, 2012.

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

TEMIN, H. M. Reverse transcription in the eukaryotic genome: Retroviruses, pararetroviruses, retrotransposons, and retrotranscripts. **Molecular Biology and Evolution**, v. 2, p.455-468, 1985.

TERAO, Daniel; DE CARVALHO, Ana Cristina Portugal Pinto; BARROSO, Teresa Cristina da Silva Ferreira. **Flores tropicais.** Brasília: Embrapa informação tecnológica, 2005.

TERRA, S. B.; ZUGE D. P. P. O. Floricultura: a produção de flores como uma nova alternativa de emprego e renda para a comunidade de Bagé-RS. **Revista Conexão UEPG**, v. 9, n. 2, p. 342-353, 2013

TEYCHENEY, P. Y. et al. ICTV Report Consortium. 2020. **ICTV virus taxonomy profile: Caulimoviridae. J Gen Virol**, v. 101, p. 1025-1026.

TEYCHENEY, P. Y.; GEERING, A. D. W. Recent Advances in Plant Virology. In: CARANTA C.; ARANDA M. A.; TEPFER M.; LÓPEZ-MOYA J. J. Caister: **Academic Press**, pp. 343–362, 2011.

VIÉGAS, M.J.I.et.al. Geração de tecnologias para o manejo sustentável de flores tropicais e temperadas no nordeste paraense / Belém, PA: Embrapa Amazônia oriental, out, 2008. 140p.. – (**Embrapa Amazônia oriental. Documentos**, 332) ISSN 1517-2201.

PEDROSA, D. M. Análise do Perfil Químico e Investigação dos Potenciais Antioxidante, Antibacteriano e Citotóxico in vitro de Extratos Obtidos do Caule de *Costus spicatus* Swartz (Costaceae). **Trabalho Conclusão de Curso**. Juiz de Fora -Jul.2017.

SIGNORI, J. V. F; CORREA, T. W. Atividade Antimicrobiana e Identificação de Compostos de Plantas Medicinais de Uso Popular. **Revista de Trabalhos Acadêmicos da FAM**, v.1, n.1; p.1-49; 2016.

DUARTE, R. C; ANDRADE, L. A; OLIVEIRA, T. Revisão da Planta *Costus Spicatus* (JACQ.) Roscoe: Pluralidade em Propriedades Medicinais. **Revista Fitos**, Rio de Janeiro, v. 11. n.2; p.119-249; 2017.

BRAINER, Maria Simone de Castro Pereira. **Flores e plantas ornamentais**. 2019.

SENAR – Serviço Nacional de Aprendizagem Rural. Plantas ornamentais: produção de flores de corte. / **Serviço Nacional de Aprendizagem Rural (SENAR)**. — Brasília: SENAR, 2016.

LINS, Severina RO; COELHO, Rildo SB. Ocorrência de doenças em plantas ornamentais tropicais no Estado de Pernambuco. **Fitopatologia Brasileira**, v. 29, p. 332-335, 2004.

ALEXANDRE, Maria Amelia Vaz; DUARTE, Lígia Maria Lembo; CHAVES, Alexandre Levi Rodrigues. Tropical ornamental plants: Brazilian overview of viral infections and management. **Ornamental Horticulture**, v. 29, n. 2, p. 251-263, 2023.

FREIRE, FRANCISCO DAS CHAGAS OLIVEIRA; MOSCA, JOSÉ LUIZ. Patógenos associados a doenças de plantas ornamentais no Estado do Ceará. **Ornamental Horticulture**, v. 15, n. 1, 2009.

AALEXANDRE, Maria Amélia Vaz et al. Vírus, viróides, fitoplasmas e espiroplasmas detectados em plantas ornamentais no período de 1992 a 2003. **Ornamental Horticulture**, v. 11, n. 1, 2005.

HAMIM, I. et al. First report of banana bunchy top virus in *Heliconia* spp. on Hawaii. **Plant Disease**, v. 101, n. 12, p. 2153, 2017.

SELVARAJAN, R.; BALASUBRAMANIAN, V.; MANDAL, B. First report of bean yellow mosaic virus in *Alpinia galanga* in India. **Journal of Plant Pathology**, v. 97, n. 3, 2015.

LIU, R. F.; YAN, H. Z.; HONG, J. L. Molecular evidence that aphid-transmitted *Alpinia* mosaic virus is a tentative member of the genus *Macluravirus*. **Archives of virology**, v. 148, p. 1211-1218, 2003.

HU, Weiyao et al. Complete genomic sequence of a novel macluravirus, *alpinia oxyphylla* mosaic virus (AloMV), identified in *Alpinia oxyphylla*. **Archives of virology**, v. 163, p. 2579-2582, 2018.

LÓPEZ CARDONA, Nathali; CASTAÑO ZAPATA, Jairo. Characterization of phytopathogenic fungi, bacteria, nematodes and viruses in four commercial varieties of *Heliconia* (*Heliconia* sp.). **Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín**, v. 65, n. 2, p. 6697-6710, 2012.

ZHANG, Jingxin et al. Characterization of *Canna* yellow mottle virus in a New Host, *Alpinia purpurata*, in Hawaii. **Phytopathology**, v. 107, n. 6, p. 791-799, 2017.

WIJAYASEKARA, Dulanjani et al. Molecular characterization of two badnavirus genomes associated with *Canna* yellow mottle disease. **Virus research**, v. 243, p. 19-24, 2018.

LI, Yongqiang et al. Characterization of a highly divergent Sugarcane mosaic virus from *Canna indica* L. by deep sequencing. **BMC microbiology**, v. 19, p. 1-8, 2019.

PRINCE, Linda M.; KRESS, W. John. *Zingiberales (Gingers and Bananas)*. **e LS**, 2001.

JAGUNIĆ, Martin et al. Grapevine badnavirus 1: Detection, genetic diversity, and distribution in Croatia. **Plants**, v. 11, n. 16, p. 2135, 2022.

GREEN, James C. et al. Viruses in flowering ginger. **Plant Disease**, 2018.

3 CAPÍTULO I

INCIDÊNCIA DE BADNAVÍRUS INFECTANDO FLORES TROPICAIS NO ESTADO DE ALAGOAS

RESUMO

Dentre as doenças que podem afetar as flores tropicais, as de etiologia viral apresentam grande importância por não possuírem controle curativo. Essas plantas podem ainda servir como fonte de inóculo de espécies virais que infectam culturas de importância econômica, como por exemplo diversos vírus pertencentes ao gênero *Badnavirus*, que pode levar a perdas de até 90% na produção dos bananais. A variabilidade genética juntamente com a capacidade de integrar total ou parcialmente seu genoma ao genoma do hospedeiro, torna a diagnose de *Badnavirus* ainda mais desafiadora. No Brasil, nenhum estudo foi realizado com a finalidade de detectar e identificar espécies de *Badnavirus* presentes em flores tropicais. Neste trabalho, amostras foliares de alpinia, *Costus* e helicônia, coletadas no estado de Alagoas, foram analisadas com a finalidade de detectar infecção e identificar o agente causal. No total 135 amostras foram analisadas e inicialmente submetidas à diagnose via PCR utilizando-se primers degenerados e, posteriormente, analisadas por RCA (*rolling circle amplification*) e RT-PCR para a confirmação da presença da forma epissomal dos vírus. Das amostras analisadas, doze foram positivas para PCR, presentes em plantas de *Costus spiralis*, *Costus spiralis* verde, Alpinia Rosa e Helicônia kiwi. Dentre estas, sete amplificaram genoma de DNA circular quando submetidas a RCA. A técnica RCA têm sido utilizadas para detectar a presença de *Badnavirus*, uma vez que detectam apenas sequências epissomais, evitando o descarte indevido de amostras com EPRV's, que apresentam resultado positivo na PCR, que amplifica indiscriminadamente sequências epissomais e endógenas. Por fim, o produto de RCA foi utilizado como molde para uma nova PCR para confirmação da forma epissomal. A validação de técnicas para a diagnose de sequências epissomais dos Badnavírus e a identificação de espécies presentes em diferentes campos onde as flores tropicais são cultivadas é de grande contribuição e relevância para o sistema de produção de mudas de flores no Brasil.

Palavras-chave: *Alpinia purpurata*, *Costus spiralis*, *Heliconia* spp., Flores de Corte, *Caulimoviridae*, PCR, RCA.

3.1 Introdução

A floricultura é um dos setores do agronegócio brasileiro em expansão, destacando-se como atividade geradora de renda e importância social pela utilização de pequenas áreas, contribuindo para a fixação das populações rurais no campo (TERRA; ZUGE, 2013; IBRAFLOR, 2015; SENAR, 2016; BRAINER, 2019). As flores tropicais possuem significância no cenário atual do mercado nacional por apresentarem características atrativas como beleza rara, diversidade de espécies, coloração e formatos, durabilidade em pós-colheita e rusticidade que favorecem a aceitação do consumidor (LUZ et al.; LOGES et al., 2005, SANTOS et al., 2017). As condições edafoclimáticas do Brasil favorecem a produção de flores tropicais em larga escala (ALMEIDA et al., 2012), sendo bem adaptadas a climas mais quentes e úmidos tipicamente encontrados na região Nordeste (LINS; COELHO, 2004; SENAR, 2016). Esta região ocupa a terceira posição nacional no cultivo de flores tropicais (BRAINER, 2019). O estado de Alagoas é o sexto produtor no ranking regional, com cultivos desenvolvidos predominantemente por agricultores familiares e destinados a produção de flores e folhagens de corte. Apesar do clima da região Nordeste ser favorável ao desenvolvimento desta atividade, observa-se uma redução no número de estabelecimentos produtores de flores tropicais. (BRAINER, 2019).

A ocorrência de viroses constitui um grande desafio na floricultura tropical, devido a ampla gama de sintomas que causam nas suas folhas e flores, reduzindo a produção, valor decorativo e qualidade do material propagativo (LINS et al., 2004; ZHANG et al., 2017; MITROTANOVA, ZAKUBANSKIY, MITROTANOVA, 2018; ALEXANDRE, DUARTE e CHAVES, 2023). Dentre as flores tropicais cultivadas no estado de Alagoas predominam aquelas que

pertencem a ordem Zingiberales, gêneros *Alpinia*, *Costus*, *Etlingera*, *Heliconia*, *Tapeinochilos* e *Zingiber*. Vírus das famílias *Bromoviridae*, *Caulimoviridae*, *Closteroviridae*, *Nanoviridae*, *Potyviridae*, *Rhabdoviridae*, *Solemoviridae*, *Tombusviridae* e *Virgaviridae* foram descritas infectando diferentes espécies de flores tropicais (FAN et al., 2019; COLLARICIO et al., 2002; LIU, YAN, HONG, 2003; FREIRE; MOSCA, 2009; RENNER et al., 2009; LÓPEZ-CARDONA et al., 2012; RIVAS et al., 2013; SELVARAJAN, MANDAL, BALASUBRAMANIAN, 2015; ZHANG et al., 2016; ZHANG, et al., 2017; HAMIN: GREEN, 2017; HU ET AL., 2018; ABRAHAM et al. 2020; BHAT et al., 2020).

O gênero *Badnavirus*, família *Caulimoviridae*, engloba pararetrovírus contendo genoma de DNA dupla fita (dsDNA) semicircular de 7.2- 9.2 kpb, encapsidados em partículas baciliformes não envelopadas, com tamanho de aproximadamente 30 nm x 120-150 nm (TEYCHENEY et al, 2020). *Badnavirus* é o maior gênero desta família com 69 espécies reconhecidas pelo ICTV (<https://talk.ictvonline.org/>). Espécies de *Badnavirus* são importantes patógenos de culturas perenes economicamente importantes em regiões tropicais e subtropicais como: abacaxi, banana, batata-doce, cacau, cana-de-açúcar, citros, inhame, pimenta-do-reino, taro e uva, causando perdas de rendimento que variam entre 10 % a 90% (BHAT, SEVARAJAN, BALASUBRAMANIAN, 2023). Propagação vegetativa e transmissão por inseto vetor, especialmente cochonilha, constituem a principal forma de disseminação desses vírus (BHAT et al., 2016; TECHENEY et al., 2020; BHAT, SEVARAJAN, BALASUBRAMANIAN, 2023). Até o momento, apenas três espécies de badnavírus foram relatadas infectando gêneros da ordem Zingiberales como *Alpinia*, *Heliconia* e *Zingiber* (CARDONA; ZAPATA, 2012; ZHANG et al., 2017; GREEN et al., 2018). A espécie *Badnavirus betamaculaflavicannae* (canna yellow mottle virus, CaYMV), foi associada a plantas de *Alpinia purpurata* exibindo sintomas de necrose e mosqueado amarelo no Havaí (ZHANG et al., 2017). *Zingiber bacilliform virus*, foi obtido de gengibre (*Zingiber officinale*) na China utilizando deep sequencing (LIAO

et al., 2018). Banana streak virus (BSV), um complexo de nove espécies, responsável por causar a doença “estria da bananeira” (BHAT, SELVARAJAN, BALASUBRAMANIAN, 2023), foi detectado causando sintomas de estrias em *Heliconia* spp. na Colômbia (CARDONA; ZAPATA, 2012) e *A. purpurata* no Havaí (GREEN et al., 2018). Nenhum estudo prévio detectou a ocorrência dessas espécies de badnavírus infectando estas hospedeiras no Brasil. Adicionalmente, não existe relato de badnavírus infectando espécies de *Costus*, *Etlingera* e *Tapeinochilos*.

Diferentes espécies de BSV, conhecidas como BSVs endógenos (eBSV), ocorrem integradas ao genoma de suas hospedeiras por processo de integração ilegítima (BHAT, HOHN, SELVARAJAN, 2016). Fato que torna um desafio a detecção baseada em PCR, por gerar resultados falsos positivos, já que os primers universais para o gênero *Badnavirus* amplificam sequências virais endógenas e epissomais (BHAT, HOHN, SELVARAJAN, 2016; BHAT, SELVARAJAN, BALASUBRAMANIAN, 2023). Uma abordagem que inclui a amplificação da sequência do genoma viral completo via *Rolling circle amplification* (RCA), seguido de detecção por PCR tem sido utilizada com sucesso na distinção de sequências integradas e epissomais de espécies de BSV (JAMES et al., 2011).

Portanto, o presente estudo teve como objetivo realizar a detecção e incidência de badnavírus que infectam flores tropicais dos gêneros *Alpinia*, *Costus* e *Heliconia*, em plantios comerciais no estado de Alagoas.

3.2 Material e Métodos

3.2.1 Obtenção do Material Vegetal

Amostras foliares de plantas das famílias Costaceae, Heliconiaceae e Zingiberaceae, exibindo sintomas indicativos de infecção por badnavírus, foram coletadas em dois plantios comerciais nos municípios de Rio Largo (Fazenda Riachão) e Maribondo (Fazenda Emília Flores LTDA), no estado de Alagoas. As amostras foram acondicionadas individualmente em sacos de papel, identificadas e, posteriormente, armazenada em ultrafreezer (-80 °C) até o processamento.

3.2.2 Detecção de badnavírus via PCR do DNA total

O DNA total foi extraído das amostras como descrito por Lodhi et al. (1994) e submetidos a detecção por *Polymerase Chain Reaction* (PCR) usando o par de oligonucleotídeos universais BADNA-FP (5'-ATGCCITTYGGIITIAARAAYGCICC-3') e BADNA-RP (5'-CCAYTTTRCAIACISCICCCCAICC-3'), que amplificam a região RT-RNaseH de espécies de badnavírus (Yang et al. 2003). As reações de PCR foram realizadas em um volume final de 15 µL, contendo 1,5 µL de tampão 10X (100 mM KCl, 100 mM Tris-HCl pH 9,0, 1% Triton-X), 1,2 µL da mistura de dNTPs a 10 mM, 0,4 µL 50 mM MgCl₂, 1 µL de cada oligonucleotídeo a 10 µM, 50 ng do DNA molde, e uma unidade de *Taq* DNA Polymerase (Ludwig), completando-se o volume com H₂O ultrapura. As condições de ciclagem incluíram uma desnaturação inicial a 94°C por 4 minutos e 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a 50°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 1 minuto, seguido de uma extensão final a 72°C por 10 minutos. Os amplicons foram analisados em gel de agarose a 1%, em tampão TAE (Tris- Acetato-EDTA), corados com brometo de etídeo e visualizados sobre luz UV.

3.2.3 Rolling Circle Amplification (RCA)

Para detectar apenas as amostras infectadas por badnavírus ocorrendo na forma episomal, amostras que apresentaram amplicons com tamanho esperado (579 pb)

, foram testadas via RCA, utilizando Illustra TempliPhi 100 Amplification Kit (GE Healthcare, Buckinghamshire, Reino Unido), seguindo as instruções do fabricante. Posteriormente, as amostras foram submetidas a uma nova reação de PCR, nas condições anteriormente descritas, com a finalidade de verificar se o vírus estava presente de forma episomal ou integrada ao genoma da planta (endógena).

3.3.3. Resultados e Discussão

Um total de 135 amostras foliares de plantas da ordem Zingiberales foi obtido nos municípios Marimbondo e Rio Largo, Alagoas: 46 de *Alpinia* (Zingiberaceae), 15 de *Costus* (Costaceae) e 74 *Heliconia* (Heliconiaceae). Entre as amostras foliares sintomáticas observou-se, predominantemente, sintomas de estrias cloróticas, amarelas e necróticas (Figura 2). No entanto, mosqueado amarelo, clorose de nervura, redução de crescimento e deformação foliar também foram encontrados. Badnavírus induzem sintomas que variam de leves, moderados a severos, os quais são influenciados pelas cultivares e estado nutricional da hospedeira; espécie do vírus e condições ambientais (BHAT, HOHN, SELVARAJAN, 2016; BHAT, SELVARAJAN, BALASUBRAMANIAN, 2023). No geral, estes sintomas incluem mosqueado, estrias cloróticas e necróticas, deformação foliar e nanismo (BHAT, HOHN, SELVARAJAN, 2016). Assim como encontrado em nosso trabalho, estrias ocorrendo nas folhas e flores, constituiu o sintoma mais comum de badnavírus associados à infecção de plantas de *Alpinia purpurata* e *Heliconia* sp. (GREEN, et al., 2018; CARDONA; ZAPATA, 2012).

A análise desses produtos de PCR revelou fragmentos com tamanho esperado, de aproximadamente 580pb, correspondente à amplificação da região RT/RNaseH, para apenas 14 das 135 amostras, correspondentes a *Costus spiralis*, *Alpinia purpurata* Rosa e *Heliconia* sp. (Tabela 1). As amostras PCR positivas foram submetidas a RCA com e sequências de DNA circular de aproximadamente 10 kb foram amplificadas a partir de oito das 14 amostras analisadas (Figura 3). Posteriormente, o produto da RCA foi utilizado como molde para uma

nova reação de PCR, obtendo-se amplificação do genoma completo e detecção episomal de badnavírus a partir de uma única amostra de *Alpinia purpurata*, variedade Rosa, proveniente do município de Marimbondo.

Quando o DNA total foi usado como molde para detecção de badnavírus via PCR, foi observada uma incidência de infecção de 10,8% (14/135). Considerando a espécie de planta hospedeira, incidências de infecção por badnavírus de 13% (6/46) e 53,3% (8/15) foram, respectivamente, encontradas para *A. purpurata* e *C. spiralis*. Já quando o RCA foi usado como molde para detecção viral via PCR, a incidência foi reduzida para 0,74% (1/135). Esses resultados em conjunto demonstram que badnavírus ocorrem na forma de sequências endógenas de paratrovírus (Endogenous Pararetroviral Sequences – EPRVs), integradas aos genomas das espécies *C. spiralis*, *C. spiralis* (variedade verde), *Heliconia* sp. *A. purpurata* (variedade Rosa).

Este constitui o primeiro relato em todo o mundo de infecção de *Costus spiralis* por badnavírus. Até o presente momento havia um único relato de infecção viral nesta hospedeira, pelo potyvírus *Costus stripe mosaic virus* (CoSMV), causando sintomas de estrias foliares verdes escuras em plantas de um jardim público na cidade de São Paulo (ALEXANDRE et al., 2020). Membros da família *Potyviridae* também são importantes patógenos que ocorrem em *Alpinia* spp. Ao menos 4 espécies já foram descritas infectando esta hospedeira, como *Alpinia mosaic virus* (AlpMV) e *Alpinia oxyphylla mosaic virus* (AloMV), gênero *Macluravirus* (LIU, YAN, HONG, 2003; HU et al., 2018); *Banana bract mosaic virus* e *Bean common mosaic virus*, gênero *Potyvirus* (ZHANG et al., 2016; LARREA-SARMIENTO et al., 2020). *Alpinia purpurata* também é hospedeira de duas espécies de badnavírus. A espécie *Badnavirus betamaculaflavicannae* (Canna yellow mottle virus, CaYMV), foi descrita pela primeira vez no Japão em 1979 (YAMASHITA, et al., 1985) e tem sido um badnavírus comumente encontrado integrado no genoma de *Canna* spp. (GREEN et al., 2018). Em 2017, no Havaí, CaYMV foi encontrado causando infecção episomal em plantas de *A. purpurata* exibindo sintomas severos como nanismo, estrias, mosqueado amarelo e necrose foliar (ZHANG et al., 2017). *Banana streak virus* (BSV), um complexo de nove espécies virais,

responsável por causar a doença estria da bananeira, é considerado um importante fator limitante em todas as áreas que cultivam banana do mundo (BHAT, SELVARAJAN, BALASUBRAMANIAN, 2023), e foi detectado por teste Elisa nas variedades comerciais Orange e Kwashi de *Heliconia*, na Colômbia (CARDONA; ZAPATA, 2012). Uma das espécies que pertence a este complexo, *Badnavirus alphavirgamusae* (banana streak GF virus, BSGFV), foi identificada por meio de PCR em plantas de *A. purpurata*, variedade vermelha, causando sintomas de estrias em folhas, flores e hastes (GREEN, et al., 2018). No entanto, não foi possível confirmar se a infecção foi integrada ou episomal. Os badnavírus CaYMV, BSGFV e o potyvírus *Banana bract mosaic virus* causam a morte súbita da alpínia vermelha, no Havaí. Epidemias dessa doença ocorreram no país em 2018, ameaçando a produção dessa cultura (GREE, et al., 2018).

Badnavírus estão amplamente disseminados como EPRVs no genoma de hospedeiras economicamente importantes como abacaxi, banana e inhame (NDOWORA et al., 1999; STAGINNUS; RICHERT-PÖGGELER, 2006; GAYRAL; ISKRA-CARUANA, 2009; SEAL, 2014). A integração de badnavírus na

hospedeira ocorre por recombinação ilegítima, e sua presença não está necessariamente associada com infecção. Contudo, em alguns casos, por indução de estresse como micropropagação *in vitro* (DALLOT et al., 2001; CÔTE et al., 2010) e cruzamentos interespecíficos (LHEUREUX et al., 2003), estas EPRVs podem dar origem a infecções virais epissomais sistêmicas com disseminação planta a planta pelo inseto vetor (BHAT, SELVARAJAN, BALASUBRAMANIAM, 2023). Sequências endógenas de BSV comumente encontradas nos cromossomos de banana do grupo *Musa balbisiana* como banana streak OL virus (BSOLV), banana streak IM virus (BSIMV) e BSGFV, são capazes de ser ativadas nas suas formas epissomais e causar infecção (CHABANNES et al., 2013; GAYRAL et al., 2008). A alta variabilidade encontrada em badnavírus somada à capacidade de se inserir no genoma da hospedeira na forma de EPRVs, tornam um desafio a diagnose, a taxonomia, o movimento de germoplasma e o manejo de doenças causadas por estes vírus (BHAT; HOHN, SELVARAJAN, 2016; BHAT, SELVARAJAN, BLASUBRAMANIAN, 2023).

Visando resolver este problema, diversas abordagens têm sido desenvolvidas para diferenciar formas virais epissomais e integradas ao hospedeiro comomicroscopia eletrônica; hibridação *Southern*; *Immunocapture* PCR (IC-PCR); *Multiplex Immunocapture* PCR (M-IC-PCR), *Rolling Circle Amplification* (RCA) e sequenciamento do genoma viral (BHAT; HOHN; SELVARAJAN, 2016; BHAT, SELVARAJAN, BALASUBRAMANIAN, 2023). A técnica de RCA foi utilizada com sucesso para realizar a distinção de sequências endógenas (EPRVs) e epissomais de badnavírus ocorrendo em banana (JAMES et al., 2011) e inhame (BÖOMER et al., 2023).

No Brasil, as informações sobre a ocorrência de badnavírus em flores tropicais não estão disponíveis. Apenas duas espécies foram descritas infectando flores ornamentais no país, *Bougainvillea chlorotic vein banding virus* (BCVBV), em *Bougainvillea spectabilis* e *B. glabra* (CHAGAS et al., 2004; ALEXANDRE et al; 2015) e *Scleffera ring spot virus* (SRV) (KITAJIMA, 2020). O presentetrabalho descreveu o primeiro relato de ocorrência de

Badnavirus, na forma epissomal, em *Alpinia purpurata*, no Brasil, e na forma endógena em *Costus spiralis*, no mundo. Contribuindo assim, para ampliação do conhecimento sobre a diversidade desses vírus ocorrendo em plantas ornamentais no país.



Figura 1: Amostras foliares de *Alpinia rosa* (A), *Costus spiralis* (B) e *Heliconia bihai maluca* (C) coletadas no município de Maribondo/AL com sintomas de estrias nas nervuras, característico de infecção por badnavírus.

Tabela 1. Localidade e espécies coletadas, número de amostras coletas por espécie, número de amostras PCR+, número de amostras que Amplificaram por Círculo Rolanda-RCA, e número de amostras PCR Epissomal.

Localidade	Espécie	Nº de amostras	PCR+	RCA+	PCR Epissomal
Rio Largo – Fazenda Riachão	<i>Heliconia</i> amarela	10	-	-	-
	<i>Heliconia</i> sexy pink	4	-	-	-
	<i>Heliconia</i> sp	2	-	-	-
	<i>Heliconia bihai</i> maluca	4	-	-	-
	<i>Heliconia bihai</i>	4	-	-	-
	<i>Heliconia</i> bico de papagaio	4	-	-	-
	<i>Alpinia purpurata</i>	7	-	-	-
	<i>Costus spiralis</i> verde	5	3	1	-
Marimbondo – Fazenda Emília Flores Tropicais	<i>Heliconia bihai</i>	9	-	-	-
	<i>Heliconia rostrata</i>	5	-	-	-
	<i>Heliconia</i> peack pink	8	-	-	-
	<i>Heliconia bihai</i> maluca	7	-	-	-
	<i>Heliconia</i> sp.	7	2	1	-
	<i>Heliconia</i> wagneriana red	10	-	-	-
	<i>Alpinia</i> rosa	10	4	1	1
	<i>Alpinia</i> red king	9	-	-	-
	<i>Alpinia</i> red	11	-	-	-
	<i>Alpinia</i> kimi	9	-	-	-
	<i>Costus spiralis</i>	10	5	5	-

4. REFERÊNCIAS

ALEXANDRE, M. Amélia V. et al. Costus stripe mosaic virus, um novo membro provisório do gênero Potyvirus. **Arquivos de virologia**, v. 165, n. 11, pág. 2541-2548, 2020.

ALEXANDRE, Maria Amelia Vaz; DUARTE, Lígia Maria Lembo; CHAVES, Alexandre Levi Rodrigues. Tropical ornamental plants: Brazilian overview of viral infections and management. **Ornamental Horticulture**, v. 29, n. 2, p. 251-263, 2023.

BHAT, A. I.; HOHN, T; SELVARAJAN, R. Badnaviruses: the current global scenario. **Viruses**, v. 8, n. 6, p. 177, 2016.

BÖMER, M.; RATHNAYAKE, A. I.; VISENDI, P.; SILVA, G.; SEAL, S. E. Complete genome sequence of a new member of the genus Badnavirus, Dioscorea bacilliform RT virus 3, reveals the first evidence of recombination in yam badnaviruses. **Archives of virology**, p.1-6, 2017.

BRAINER, Maria Simone de Castro Pereira. Flores e plantas ornamentais. 2019.

BRAITHWAITE, K. S., EGESKOV, N. M., & SMITH, G. R. (1995). Detection of sugarcane bacilliform virus using the polymerase chain reaction. **Plant disease. USA**.

CHABANNES, M.; BAURENS, F. C.; DUROY, P. O.; BOCS, S.; VERNEREY, M.S.; RODIER-GOUD, M.; BARBE, V.; GAYRAL, P.; ISKRA-CARUANA, M. L. Three infectious viral species lying in wait in the banana genome. **Journal of Virology**, v. 87, p. 8624-8637, 2013.

COELHO NETTO, Rosalee A. et al. Murcha bacteriana no estado do Amazonas, Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, v. 29, p. 17-23, 2004.

COELHO, R. S. B.; WARUMBY, J. F. Doenças de plantas ornamentais tropicais detectadas na Zona da Mata de Pernambuco. **Floricult. Pernamb**, v. 1, p. 67-69, 2002.

CÔTE, F. X.; GALZI, S.; FOLLIOT, M.; LAMAGNÈRE, Y.; TEYCHENEY, P. Y.; ISKRACARUANA, M. L. Micropropagation by tissue culture triggers differential expression of infectious endogenous Banana streak virus sequences (eBSV) present in the Bgenome of natural and synthetic interspecific banana plantains. **Molecular Plant Pathology**, v.11, p.137-144, 2010.

DALLOT, S.; ACCUNA, P.; RIVERA, C.; RAMIREZ, P.; COTE, F.; LOCKHART, B. E.L.; CARUANA, M. L. Evidence that the proliferation stage of micropropagation procedure is determinant in the expression of Banana streak virus integrated into the genome of the FHIA21 hybrid (Musa AAAB). **Archives of Virology**, v. 146, p. 2179-2190, 2001.

DEAN, F. B., NELSON, J. R., GIESLER, T. L., & LASKEN, R. S. (2001). Rapid amplification of plasmid and phage DNA using phi29 DNA polymerase and multiplyprimed rolling circle amplification. *Genome research*, 11(6), 1095-1099.

DOS SANTOS, Josiane Silva Costa et al. Produção de flores tropicais: uma análise econômica na agricultura familiar em Mato Grosso. In: **Anais do Congresso Brasileiro de Custos-ABC**. 2017.

FREIRE, FRANCISCO DAS CHAGAS OLIVEIRA; MOSCA, JOSÉ LUIZ. Patógenos associados a doenças de plantas ornamentais no Estado do Ceará. **Ornamental Horticulture**, v. 15, n. 1, 2009.

GASPAROTTO, Luadir et al. Heliconia psittacorum: hospedeira de Mycosphaerella fijiensis, agente causal da sigatoka-negra da bananeira. **Fitopatologia Brasileira**, v. 30, p. 423-425, 2005.

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

GEERING, A. D. W.; HULL, R. Family Caulimoviridae. In: KING A.M.Q.; ADAMS M.J.; CARSTENS E.B.; LEFKOWITZ, E.J. *Virus Taxonomy*. 9th Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. London UK. Elsevier Academic Press, p. 429-443, 2012.

GIBBS, M. J; WEILLER, G. F. Evidence that a plant virus switched hosts to infect a vertebrate and then recombined with a vertebrate-infecting virus. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 96, n. 14, p. 8022-8027, 1999.

ISHWARA BHAT, Alangar; SELVARAJAN, Ramasamy; BALASUBRAMANIAN, Velusamy. Emerging and re-emerging diseases caused by Badnaviruses. **Pathogens**, v. 12, n. 2, p. 245, 2023.

JAMES, AP et al. Desenvolvimento de uma nova técnica de amplificação por círculo rolante para detectar o vírus da raia de banana que também discrimina entre sequências de vírus integrados e epissômicos. **Doença de planta**, v. 95, n. 1, pág. 57-62, 2011.

JOHNE, R. et al. **Rolling-circle amplification of viral DNA genomes using phi29 polymerase**. Trends in Microbiology, Cambridge, v. 17, n. 5, p. 205-211, May 2009.

KITAJIMA, Elliot W. An annotated list of plant viruses and viroids described in Brazil (1926-2018). **Biota Neotropica**, v. 20, 2020.

LANEY, A.G.; HASSAN, M.; TZANETAKIS, I.E. **An integrated Badnavirus is prevalent in fig germplasm**. Phytopathology. v.102, p. 1182-1189. 2012.

LIU, F., FENG, L., CHEN, X., HAN, Y., LI, W., XU, W., ... & LIN, M. (2012). Simultaneous detection of four banana viruses by multiplex PCR. **Journal of Phytopathology**, 160(11-12), 622-627.

LOCKHART, B. E. L.; JONES, D. R. Banana streak mosaic. In: JONES, D.R. (Ed.). Diseases of Banana, Abaca and Enset. Wallingford: CAB International. 2000.

METTE, M. F.; KANNO, T.; AUFSATZ, W.; JAKOWITSCH, J.; Van Der WINDEN, J.; MATZKE, M. A.; MATZKE, A. J. M. Endogenous viral sequences and their potential contribution to heritable virus resistance in plants. EMBOJ, v. 21, p. 461–469, 2002.

MITROFANOVA, Olga Vladimirovna. Viruses infecting main ornamental plants: an overview. **Ornamental Horticulture**, v. 24, p. 95-102, 2018.

MONCI, F.; SÁNCHEZ-CAMPOS, S.; NAVAS-CASTILLO, J.; MORIONES, E. A natural recombinant between the geminiviruses Tomato yellow leaf curl Sardinia virus and Tomato yellow leaf curl virus exhibits a novel pathogenic phenotype and is becoming prevalent in Spanish populations. **Virology**, v. 303, n. 2, p. 317-26, 2002.

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

PADIDAM, M.; BEACHY, R.N.; FAUQUET, C.M. A phage single-stranded DNA (ssDNA) binding protein complements ssDNA accumulation of a geminivirus and interferes with viral movement. **Journal of Virology**, v. 73, p. 1609-1616, 1999.

PITA, J. S.; FONDONG, V. N.; SANGARÉ, A.; OTIM-NAPE, G. W.; OGWAL, S.; FAUQUET, C. M. Recombination, pseudorecombination and synergism of geminiviruses are determinant keys to the epidemic of severe cassava mosaic disease in Uganda. **Journal of General Virology**, v. 82, p. 655-665, 2001.

REAGIN, M. J. et al. TempliPhi: a sequencing template preparation procedure that eliminates overnight cultures and DNA purification. *Journal of Biomolecular Techniques*, Bethesda, v. 14, n. 2, p. 143-148, June 2003.

RICHERT- PÖGGELER, K. R.; NOREEN, F.; SCHWARZACHER, T.; HARPER, G.; HOHN, T. Induction of infectious petunia vein clearing (pararetro) virus from endogenous provirus in petunia. **EMBO Journal**, v. 22, p. 4836-4845, 2003.

RIVAS, Eliana B. et al. A new Badnavirus species detected in Bougainvillea in Brazil. **Journal of General Plant Pathology**, v. 71, p. 438-440, 2005.

SEAL, S.; TURAKI, A.; MULLER, E.; KUMAR, P.L.; KENYON, L.; FILLOUX, D.; GALZI, S.; LOPEZ-MONTES, A.; ISKRA-CARUANA, M. L. The prevalence of badnaviruses in West African yams (*Dioscorea cayenensis-rotundata*) and evidence of endogenous pararetrovirus sequences in their genomes. **Virus Research**, v. 186, p. 144-154, 2014.

SENAR – Serviço Nacional de Aprendizagem Rural. Plantas ornamentais: produção de flores de corte. / **Serviço Nacional de Aprendizagem Rural (SENAR)**. — Brasília: SENAR, 2016.

SHAHID, M.S.; ABOUGHANEM-SABANADZOVIC, N.; SABANADZOVIC, S.; TZANETAKIS, I.E. Genomic characterization and population structure of a Badnavirus infecting blackberry. **Plant disease**, v.101, p. 110-115. 2017.

SHARMA, S. K.; KUMAR, P. V.; GEETANJALI, A. S.; PUN, K. B.; BARANWAL, V. K. Subpopulation level variation of banana streak viruses in India and common Evolution of banana and sugarcane badnaviruses. **Virus genes**, v. 50, n. 3, p. 450-465, 2015.

SQUIRES, J.; GILLESPIE, T.; SCHOELZ, J.E; PALUKAITIS, P. Excision and episomal replication of cauliflower mosaic virus integrated into a plant genome. **Plant Physiology**, v.155, p. 1908-1919, 2011.

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

YANG, I. C. et al. Genomic characterisation of taro bacilliform virus. **Archives of Virology**, v. 148, p. 937-949, 2003.

ZHANG, J. et al. Multiplex detection of three banana viruses by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP). **Tropical Plant Pathology**, v. 43, n.6,p. 543-551, 2018.

ZHANG, Jingxin et al. Characterization of Canna yellow mottle virus in a New Host, *Alpinia purpurata*, in Hawaii. **Phytopathology**, v. 107, n. 6, p. 791-799, 2017.

1 Detecção epissomal e sequenciamento do genoma completo de Banana Streak GF virus
2 em *Alpinia purpurata* no Brasil.

3
4
5 Maria Helloá Costa de Oliveira¹; Sarah J.C. Silva^{1*}; Mayra M.M. Ferro¹; Iraildes P. Assunção¹;
6 Gaus S.A. Lima¹;

7
8 ¹Campus de Engenharias e Ciências Agrárias, Universidade Federal de Alagoas, Rio Largo,
9 Alagoas, 57100-000, Brazil

10
11 ***Corresponding authors:** SJCS (sarah.silva@ceca.ufal.br);

21 **Resumo**

22 *Badnavirus alphavirgamusae* (*Caulimoviridae*, *Badnavirus*), um dos agentes causais do
23 complexo da doença estria da bananeira, foi identificado por PCR infectando planta tropical
24 ornamental *A. purpurata*, no Havaí. No entanto, o genoma desse isolado não foi caracterizado.
25 Em 2021, uma planta de *A. purpurata* exibindo sintomas de infecção por badnavírus, estrias
26 cloróticas e mancha foliar, foi coletada em um plantio comercial de flores tropicais no
27 município de Marimbondo, Alagoas, Brasil. Para caracterização molecular, o genoma viral foi
28 amplificado por amplificação por círculo rolante (RCA). O produto da reação de RCA,
29 foi usado como molde para detecção de badnavirus por PCR, utilizado primers universais para
30 o gênero. Seguida a confirmação de infecção episomal do badnavírus em *A. purpurata*, o
31 produto de RCA submetido a sequenciamento de alto rendimento (HTS) *Illumina*. Uma
32 sequência de genoma completo de comprimento 7.148 pb foi recuperada de 13.500 reads com
33 uma profundidade de cobertura de 180x. Com base na identidade de sequências de nucleotídeos
34 pareadas, com base nos domínios da transcriptase reversa (RT) e ribonuclease H (RNAse H), o
35 isolado de badnavírus proveniente de *A. purpurata* pertence a espécie *Badnavirus*
36 *alphavirgamusae* (banana streak GF virus, BSGFV), com 97,1% de indentidade nucleotídica. Na
37 árvore filogenética de inferência Bayesiana, o BSGFV_BR_ALPÍNIA agrupou com outra sequência de BSGFV,
38 proveniente de bananeira. BSGFV_BR_ALPÍNIA foi identificado como possível recombinante
39 breakpoints de recombinação ocorrendo no início da ORF III, identificando banana streak VN
40 virus como maior parental. Este constitui o primeiro relato de *Badnavirus alphavirgamusae*
41 (BSGFV) infectando *Alpina purpurata* no Brasil.

42 **Palavras-chave:** Zingiberaceae, banana streak virus, *Caulimoviridae*, high-throughput
43 sequencing.

45 **Introdução**

46 *Alpinia purpurada* é uma espécie da família Zingiberaceae que possui brácteas de
47 coloração variando de vermelha à rosa com alto valor ornamental como flor de corte e
48 paisagismo (TERAO et al., 2005). Esta espécie está inserida no setor de flores do Brasil, que
49 possui grande importância econômica e social, movimento quase 11 bilhões de reais, e
50 empregando 210 mil pessoas no ano de 2021 (IBRAFLO 2021). A ocorrência de patógenos
51 em plantas ornamentais tropicais, especialmente vírus, afeta a produção e qualidade de flores e
52 folhagens (ALEXANDRE, DUARTE, CHAVES, 2023). Vírus que pertencem às famílias
53 *Caulimoviridae* e *Potyviridae* já foram descritos infectando *A. purpurata* (LIU, YAN, HONG,
54 2003; ZHANG et al., 2016; LARREA-SARMIENTO et al., 2020; ZHAN et al., 2017; GREEN
55 et al., 2018).

56 Os vírus pertencentes ao gênero *Badnavirus* (família *Caulimoviridae*) possuem genoma
57 de DNA semicircular de fita dupla, com 7,2-9,2 kbp de comprimento e encapsidados em
58 partículas baciliformes não envelopadas (TEYCHENEY et al., 2020). O genoma viral de
59 badnavírus possui, de um modo geral, três principais ORFs (Open Reading Frames) e ORFs
60 adicionais conhecidas como ORF4, ORFX e ORFY, as quais nenhuma função biológica foi
61 atribuída (BHAT, HOHN, SELVARAJAN, 2016; MULLER et al., 2018; TEYCHENEY et al.,
62 2020). A ORF I codifica uma proteína associada ao vírion de 20,8 a 23 kDa (P1). A ORF II,
63 codifica uma proteína de 14,5 a 15 kDa (P2) que possui função de ligação a ácido nucléico
64 (CHENG et al., 1996; JACQUOT et al., 1996). Enquanto a ORF III codifica uma poliproteína
65 contendo os domínios conservados para a proteína de movimento, proteína capsidial, aspartato
66 protease, transcriptase reversa (RT), e ribonuclease H (RNase H) (TEYCHENEY et al., 2020).

67 Badnavírus infectam uma ampla gama de culturas economicamente importantes como
68 abacaxi, banana, batata-doce, cacau, cana-de-açúcar, citros, inhame, pimenta do reino, taro e
69 uva. Esses vírus são disseminados predominantemente por propagação vegetativa

e, secundariamente, por insetos vetores, cochonilhas e pulgão (BHAT, SELVARAJAN, BALASUBRAMANIAN, 2023).

Banana streak GF virus, foi detectada via PCR, causando sintomas de estrias em folhas, flores e hastes de *A. purpurata* (Red Ginger), no Havaí (GREEN, et al., 2018). No entanto, não foi confirmada a presença de infecção epissomal e tampouco realizado o sequenciamento do genoma desta espécie. Aqui, a sequência completa do genoma de um isolado da espécie *Badnavirus alphavirgamusae* (banana streak GF virus, BSGFV) associado a *A. purpurata* (variedade Rosa), foi molecularmente caracterizada usando sequenciamento de alto rendimento (High-throughput Sequencing – HTS).

Materiais e Métodos

Uma amostra foliar de *A. purpurata* (variedade Rosa), exibindo sintomas típicos de infecção por badnavírus, como estrias cloróticas e mosqueado, foi coletada em uma importante área de produção e comercialização de flores tropicais no município de Marimbondo, estado de Alagoas, Brasil, em 2021 (Figura1). Para detecção de badnavírus e caracterização molecular do genoma, DNA total foi extraído do tecido foliar da planta usando o protocolo descrito em Lodhi et al. (1994) e enriquecido via amplificação por círculo rolante (RCA), usando o kit de amplificação Illustra TempliPhi (GE Healthcare, Buckinghamshire, Reino Unido) de acordo com as recomendações do fabricante. Posteriormente, o produto de RCA foi submetido a PCR utilizando os primers BadnaFP/BadnaRP, que amplificam um fragmento de ~580 pb correspondente a região RT-RNase H (Yang et al. 2003), para fins de detecção da forma epissomal do vírus. A reação de PCR foi realizada em um volume total de 15 µL, contendo 1,5 µL de tampão 10x (100 mM KCl, 100 mM Tris-HCl pH 9,0, 1% Triton-X), 1,2 µL de 2,5 mM

92 dNTPs, 0,4 µL 50 mM MgCl₂, 0,2 µL de Taq DNA polimerase, 1,0 µL de cada oligonucleotídeo
 (10 µM), 1,0 µL (50 ng) de DNA total, completando-se o volume com H₂O ultrapura.

As condições de ciclagem incluíram uma desnaturação inicial a 94°C por 4 minutos e 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a 50°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 1 minuto, seguido de uma extensão final a 72°C por 10 minutos. Os amplicons foram analisados em gel de agarose a 1%, em tampão TAE (Tris- Acetato-EDTA), corados com brometo de etídeo e visualizados sobre luz UV.

93 Após confirmação da presença no vírus na forma episomal, o RCA foi submetido
 94 a sequenciamento de alto rendimento (HTS) usando o Illumina 93 MiSeq (250 bp paired-end)
 95 no Laboratório Central de Tecnologias de Alto Desempenho (LaCTAD) na Universidade
 96 Estadual de Campinas (Campinas, São Paulo, Brasil).

97 Foram obtidos reads de 151 pb que foram processados para verificação da qualidade,
 98 usando o software Fastqc v0.11.9 (www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/) e as
 99 sequências do adaptador foram cortadas com Trimmomatic v.0.39 (Bolger et al., 2014). Foram
 100 feitas várias montagens usando o software Spades v. 3.15.5 (Bankevich et al., 2012). Os contigs
 101 gerados foram importados para o programa Geneious v.7.1 (Kearse et al., 2012), onde foi criado
 102 um banco de dados (Viral RefSeq) com sequências virais referência de interesse. Em seguida,
 103 os contigs gerados foram inicialmente analisados com o algoritmo

BLASTn (Altschul et al., 1990) e o banco de dados de nucleotídeos não-redundante GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank) para determinar as espécies virais com as quais elas compartilham maior identidade de sequência.

104 Sequências genômicas completas de badnavírus associados à bananeira (*Musa* spp.) foram
 105 recuperadas do NCBI-GenBank (acessado em 04 de julho de 2023; Tabela1) e alinhadas com o
 106 genoma obtido no presente estudo, usando o algoritmo MUSCLE (Edgar, 2004). Adicionalmente,
 107 as sequências de RT-RNase H (~1.230 pb) foram recuperadas dos genomas alinhados.
 108 Comparações pareadas para demarcação de espécies foram realizadas para os genomas
 109 completos e conjuntos de dados RT-RNase H, usando *Sequence Demarcation Tool* (SDT) v.1.2

(Muhire et al., 2014). Para detectar eventos de recombinação e isolados parentais e recombinantes putativos, os genomas completos foram analisados, usando o *Recombination Detection Program* (RDP) v.4. (Martin et al., 2015), com eventos de recombinação previstos por pelo menos cinco métodos diferentes sendo considerados confiável.

A análise filogenética foi baseada no conjunto de dados de genomas completos e sequências nucleotídicas de RT-RNase H, usando Inferência Bayesiana (BI) em MrBayes v.3.2.3 (Ronquist et al., 2012) por meio do no *web portal* CIPRES (Miller et al., 2010). Os modelos mais adequados de substituições de nucleotídeos foram selecionados de acordo com o Critério de Informação de Akaike (AIC), usando MrModelTest v.2.3 (Nylander, 2004). A análise de BI foi realizada, usando duas réplicas de quatro cadeias cada para 10 milhões de gerações com amostragem a cada 1.000 passos. Um total de 15.000 árvores (7.500 por execução) foram usadas (após uma fase de queima) para determinam os valores de probabilidade posterior (Rannala e Yang, 1996), as árvores foram visualizadas e editadas no FigTree v.1.4 (ztree.bio.ed.ac.uk/software/figtree).

Resultados e discussão

O sequenciamento *Illumina* da amostra *Alpinia purpurata* (AR2) resultou em um genoma completo de badnavírus de 7.148 pb, montado a partir de 13.500 reads leituras, com profundidade de cobertura de 180x. De acordo com o critério para a demarcação de espécie do *International Committee on Taxonomy of Viruses* (ICTV), de $\geq 80\%$ de identidade nucleotídica para os loci RT-RNase H de *Badnavirus*, o genoma estudado foi identificado como um isolado da espécie *Badnavirus alphavirgamusae* (banana streak GF virus, BSGFV). A análise SDT mostrou que a sequência de RT-RNase H do isolado AR2 está mais intimamente relacionado ao BSGFV, com 97,1% de identidade de nucleotídica, assim como para a análise do genoma completo, onde compartilha 97,4% de identidade com o mesmo vírus (Figuras 2 e 3).

134 O genoma completo derivado de sequenciamento *Illumina* no presente estudo possui
7.148
135 pb, sendo referido como BSGFV_BR_ALPINIA. Três ORFs (ORFs 1-3) foram previstas para
o
136 genoma viral do isolado BSGFV_BR_ALPINIA, com motivos altamente conservados, como a
137 sequência do sítio de ligação do iniciador tRNA^{met}, TATA box e o sinal de poliadenilação.
138 Duas pequenas proteínas de 175 e 112 aminoácidos (aa) são codificadas pela ORF1 (476 -1003
139 nt) e ORF2 (1000-1338 nt), respectivamente, enquanto a ORF3, engloba os nucleotídeos 1335-
140 6728 nt, que codifica uma poliproteína com 1797 aa.

141 Para confirmar o padrão de recombinação ocorrendo nestes vírus, foram analisados os
142 genomas completos, usando o pacote RDP. Um único evento de recombinação em
143 BSGFV_BR_ALPINIA associado a valores P estatisticamente significativos foi detectado por
144 5 programas. O evento identificou o *Badnavirus iotavirgamusae* (banana streak VN virus,
145 BSVNV), como sequência possível maior parental, sendo os breakpoints recombinação
146 localizados entre os nucleotídeos 1.458 e 2.349 (porção inicial da ORF3). No entanto,
147 BSGFV_BR_ALPINIA não foi detectado como possível parental em eventos de recombinação
148 detectados nas demais espécies de BSV analisadas. Estudos prévios demonstraram que
149 recombinação contribuir com o aumento da variabilidade genética de badnavírus que infectam
150 as culturas do cacau (*Theobroma cacao*), banana (*Musa spp.*) e inhame (*Dioscorea rotundata*).
151 Similarmente, BSGFV_BR_ALPINIA foi identificada com uma espécie recombinante,
152 reforçando a hipótese que este mecanismo evolutivo pode ser importante para diversificação de
153 badnavírus que infectam banana.

154 O relacionamento filogenético observado para os conjuntos de dados analisados,
155 corroboram com as análises de comparações pareadas de sequências nucleotídicas; o isolado
BSGFV_BR_ALPINIA está mais intimamente relacionado com o
156 BSGFV. É importante notar que, apesar de algumas incongruências topológicas, as filogenias

para RT/RNaseH evidenciam o agrupamento inferido para o conjunto de dados composto de genomas completos (Figuras 4 e 5; Tabela1).

Até o momento, apenas duas espécies de badnavírus foram descritas infectando *A. purpurata*. *Badnavirus betamaculaflavicannae* (Canna yellow mottle virus, CaYMV), originalmente obtida da planta ornamental tropical *Canna* spp., no Japão, em 1979 (Yamashita, et al., 1985). Esta espécie é amplamente distribuída, sendo encontrada em áreas de cultivo de *Canna* nos Estados Unidos (Momol et al. 2004; Pappu et al., 2008), Itália e Holanda (Marino et al., 2008), Índia (Kumari et al., 2014) e Kenya (Agneroh et al., 2015). Em 2017, a sequência completa de CaYMV foi obtida por Next Generation Sequencing (NGS) a partir de plantas de *A. purpurata* exibindo sintomas de mosqueado, estria e necrose foliar no Havaí (ZHANG et al., 2017). O complexo banana streak virus (BSV), foi identificado pela primeira vez no Marrocos, em 1974 (LOCKHART, 1986). Atualmente, assume-se que esta doença ocorre em todas as áreas de cultivo de banana do mundo, causando impacto na produtividade, qualidade de frutos e movimento de germoplasma (BHAT, HOHN, SELVARANJAN, 2016; BHAT, SELVARAJAN, BALASUBRAMANIAN, 2023). No Brasil, BSV foi descrito pela primeira vez em infecção mista com cucumber mosaic virus (*Bromoviridae*, *Cucumovirus*) causando “estria da bananeira” em mudas de banana da cultivar Mysore (BRIOSO, 2000). Espécies do complexo BSV foram detectadas em mais de 11 estados do país, incluindo *Badnavirus alphavirgamusae* (banana streak GF virus, BSGFV) (FIGUEIREDO et al., 2006; BRIOSO et al., 2011; CARNELOSSI et al., 2014). BSGFV é comumente encontrado na forma de sequências endógenas (eBSVs) integradas no genoma de banana do grupo *Musa balbisiana* AAB (CHABANNES et al., 2013; UMBER et al., 2022). Infecções por BSGFV que surgem da ativação de eBSVs predominam sobre infecções causadas por transmissão por vetor. Adicionalmente, estresse abiótico como, por exemplo, cultura de tecidos é capaz de

promover a ativação de formas epissomais de eBSVs de BSGFV (UMBER et al., 2022). No Brasil, as formas endógena e epissomal de BSGFV, foram relatadas em acessos de bananeira do banco de germoplasma de Embrapa (PESTANA, 2019).

Em 2018, BSGFV foi detectada por PCR em plantas de *A. purpurata* (variedade vermelha) exibindo sintomas de estrias em folhas, flores e hastes (GREEN, et al., 2018). No entanto, informações sobre a região do genoma usada para realizar a detecção desta espécie, na planta hospedeira, e sequência de nucleotídeos não estão disponíveis.

No presente estudo, a sequência completa do badnavírus banana streak GF virus (BSGFV) infectando *Alpinia purpurata* foi determinada pela primeira vez. Este consiste no primeiro relato de ocorrência epissomal desta espécie no Brasil, contribuindo com estudos sobre a diversidade desses vírus em *A. purpurata*. Até o presente momento, no Brasil, este badnavírus estava restrito apenas a bananeira, dessa forma este estudo amplia a gama de hospedeira BSGFV no país. Considerando a importância da bananicultura, a identificação da ocorrência de BSGFV na forma epissomal em *A. purpurata*, indica que esta pode desempenhar um importante papel na disseminação atuando como um reservatório desse vírus. Em Alagoas, eBSVs foram detectados integrados no genoma de *Alpinia purpurata* variedades Rosa e Kimi (dados do autor), no entanto, a identificação dos badnavírus relacionados a estas sequências se encontra em andamento. Também, não foi identificado se o genoma completo obtido via sequenciamento HTS foi resultante de evento de ativação de eBSVs de BSGFV_BR_ALPINIA integrados no genoma de *A. purpurata*.

219 Considerações finais

- 220 A espécie *Badnavirus alphavirgamusae*, (banana streak GF virus) é a espécie
221 responsável por causar estria foliar em *Alpinia purpurata*;
222 Este é o primeiro relato de ocorrência BSGFV em *A. purpurata* no Brasil;
223 Este trabalho consiste na determinação da primeira sequência do genoma completo de
224 um isolado de BSGFV proveniente de *A. purpurata*;
225 Estudos adicionais são necessários para demonstrar a importância de *A. purpurata* como
226 reservatório de vírus para a cultura da bananeira;

227227

228228

229229

230230

231231

232232

233233

234234

235235

236236

237 Referências

- 238 ALEXANDRE, Maria Amelia Vaz; DUARTE, LÍgia Maria Lembo; CHAVES, Alexandre Levi
239 Rodrigues. Tropical ornamental plants: Brazilian overview of viral infections and
240 management. **Ornamental Horticulture**, v. 29, n. 2, p. 251-263, 2023.
- 241 ALTSCHUL, Stephen F. et al. Basic local alignment search tool. **Journal of molecular**
242 **biology**, v. 215, n. 3, p. 403-410, 1990.
- 243 BANKEVICH, Anton et al. SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to
244 single-cell sequencing. **Journal of computational biology**, v. 19, n. 5, p. 455-477, 2012.
- 245 BOLGER, Anthony M.; LOHSE, Marc; USADEL, Bjoern. Trimmomatic: a flexible trimmer
246 for Illumina sequence data. **Bioinformatics**, v. 30, n. 15, p. 2114-2120, 2014.
- 247 BRIOSO, Paulo ST et al. Infecção mista em bananeiras pelos vírus do mosaico do pepino ("
248 Cucumber mosaic virus"-CMV) e da risca da bananeira (" Banana streak virus"-BSV) no
249 Brasil. **Summa Phytopathologica**, v. 26, n. 2, p. 254-257, 2000.
- 250 CHENG, C.; LOCKHART, B. E. L; OLSZEWSKI, N. E. The ORF I and II proteins of
251 Commelina yellow mottle virus are virion-associated. **Virology**. v. 223, n. 2, p. 263-71, 1996.
- 252 DA SILVA, Janúbia M. et al. Incidence and species diversity of badnaviruses infecting
253 sugarcane from a germplasm collection in Brazil. *Tropical Plant Pathology*, v. 40, p. 212-217,
254 2015.
- 255 EDGAR, Robert C. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high
256 throughput. *Nucleic acids research*, v. 32, n. 5, p. 1792-1797, 2004.
- 257 GREEN, James C. et al. Viruses in flowering ginger. *Plant Disease*, 2018.
- 258 INOUE-NAGATA, Alice K. et al. A simple method for cloning the complete begomovirus
259 genome using the bacteriophage ϕ 29 DNA polymerase. *Journal of virological methods*, v. 116,
260 n. 2, p. 209-211, 2004.
- 261 INSTITUTO BRASILEIRO DE FLORICULTURA - IBRAFLOR, 2022. Disponível em:
262 http://www.ibraflor.com/ns_mer_interno.php. Acesso em: julho de 2023.

263

- 264 ISHWARA BHAT, Alangar; SELVARAJAN, Ramasamy; BALASUBRAMANIAN,
265 Velusamy. Emerging and re-emerging diseases caused by Badnaviruses. *Pathogens*, v. 12, n. 2,
266 p. 245, 2023.
- 267 JACQUOT, E.; HAGEN, L. S.; JACQUEMOND, M.; YOT, P. The open reading frame 2
268 product of cacao swollen shoot badnavirus is a nucleic acid-binding protein. **Virology**, v. 225,
269 p. 191-195, 1996.
- 270 KEARSE, Matthew et al. Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software
271 platform for the organization and analysis of sequence data. **Bioinformatics**, v. 28, n. 12, p.
272 1647-1649, 2012.
- 273 LARREA-SARMIENTO, Adriana et al. Identification and complete genomic sequence of a
274 novel sadwavirus discovered in pineapple (*Ananas comosus*). **Archives of Virology**, v. 165, p.
275 1245-1248, 2020.
- 276 LIMA, Joyce Silva et al. Variabilidade genética de isolados de badnavírus infectando inhame
277 (*Dioscorea* spp.) no nordeste do Brasil. **Tropical Plant Pathology**, v. 38, p. 349-353, 2013.
-
- 278 LIOU, R. F.; YAN, H. Z.; HONG, J. L. Molecular evidence that aphid-transmitted *Alpinia*
279 mosaic virus is a tentative member of the genus *Macluravirus*. **Archives of virology**, v. 148, p.
280 1211-1218, 2003.
- 281 LODHI, Muhammad A. et al. A simple and efficient method for DNA extraction from
282 grapevine cultivars and *Vitis* species. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 12, p. 6-13, 1994.
- 283 MUHIRE, Brejnev Muhizi; VARSANI, Arvind; MARTIN, Darren Patrick. SDT: a virus
284 classification tool based on pairwise sequence alignment and identity calculation. **PloS one**, v.
285 9, n. 9, p. e108277, 2014.
- 286 MULLER, Emmanuelle et al. Next generation sequencing elucidates cacao badnavirus
287 diversity and reveals the existence of more than ten viral species. **Virus research**, v. 244, p.
288 235-251, 2018.
- 289 NYLANDER, Johan AA et al. Bayesian phylogenetic analysis of combined data. **Systematic**
290 **biology**, v. 53, n. 1, p. 47-67, 2004.
- 291 RAMOS-SOBRINHO, Roberto et al. A complex of badnavirus species infecting cacao reveals
292 mixed infections, extensive genomic variability, and interspecific recombination. **Viruses**, v.
293 12, n. 4, p. 443, 2020.

- 294 RONQUIST, Fredrik et al. MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model
295 choice across a large model space. **Systematic biology**, v. 61, n. 3, p. 539-542, 2012.
- 296 TERAQ, Daniel; DE CARVALHO, Ana Cristina Portugal Pinto; BARROSO, Teresa Cristina
297 da Silva Ferreira. **Flores tropicais**. Brasília: Embrapa informação tecnológica, 2005.
- 298 TEYCHENEY, Pierre-Yves et al. ICTV virus taxonomy profile: Caulimoviridae. **The Journal**
299 **of general virology**, v. 101, n. 10, p. 1025, 2020.
- 300 YANG, I. C. et al. Sequence diversity of South Pacific isolates of Taro bacilliform virus and
301 the development of a PCR-based diagnostic test. **Archives of Virology**, v. 148, p. 1957-1968,
302 2003.
- 303 ZHANG, Jingxin et al. Characterization of Canna yellow mottle virus in a New Host, *Alpinia*
304 *purpurata*, in Hawaii. **Phytopathology**, v. 107, n. 6, p. 791-799, 2017.
- 305305
- 306306
- 307307
- 308308
- 309309
- 310310
- 311311
- 312312
- 313313
- 314314
-

3153 **Lista de Figuras**

1
5



3163
1
6

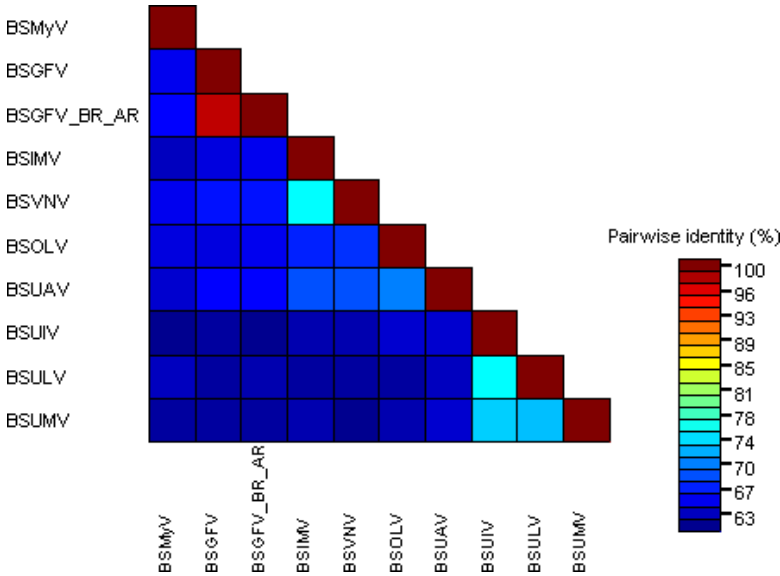
317 **Figura 1:** Sintomas de estrias cloróticas em *Alpinia purpurata* característico de infecção por
318 *Badnavirus alphavirgamusae* (BSGFV).

319319

320320

321321

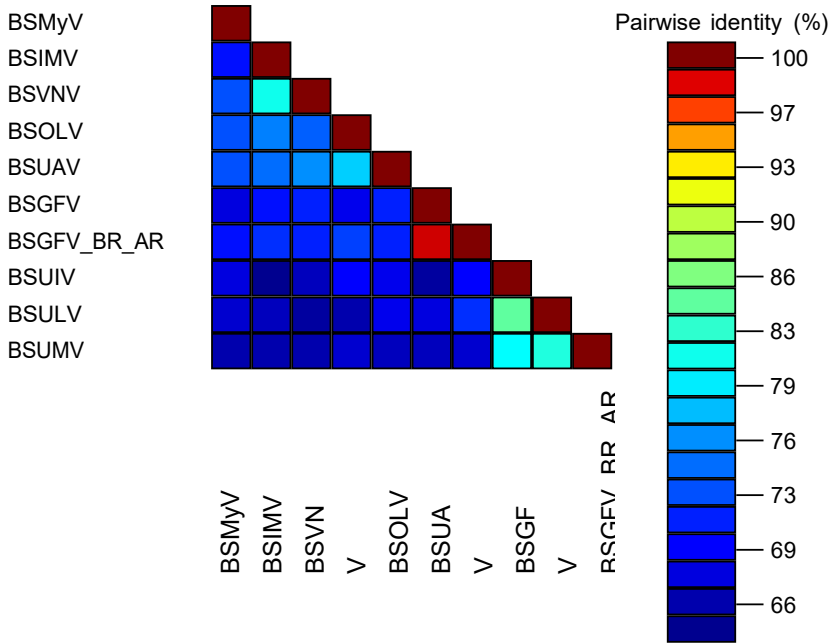
322322



323323

324 **Figura 2.** Porcentagem de identidade entre as sequencias de nucleotídeos do genoma completo
325 do isolado BSGFV_BR_ALPINIA detectado no Brasil e sequencias de vírus mais estreitamente
326 relacionados depositadas no GenBank.

327327



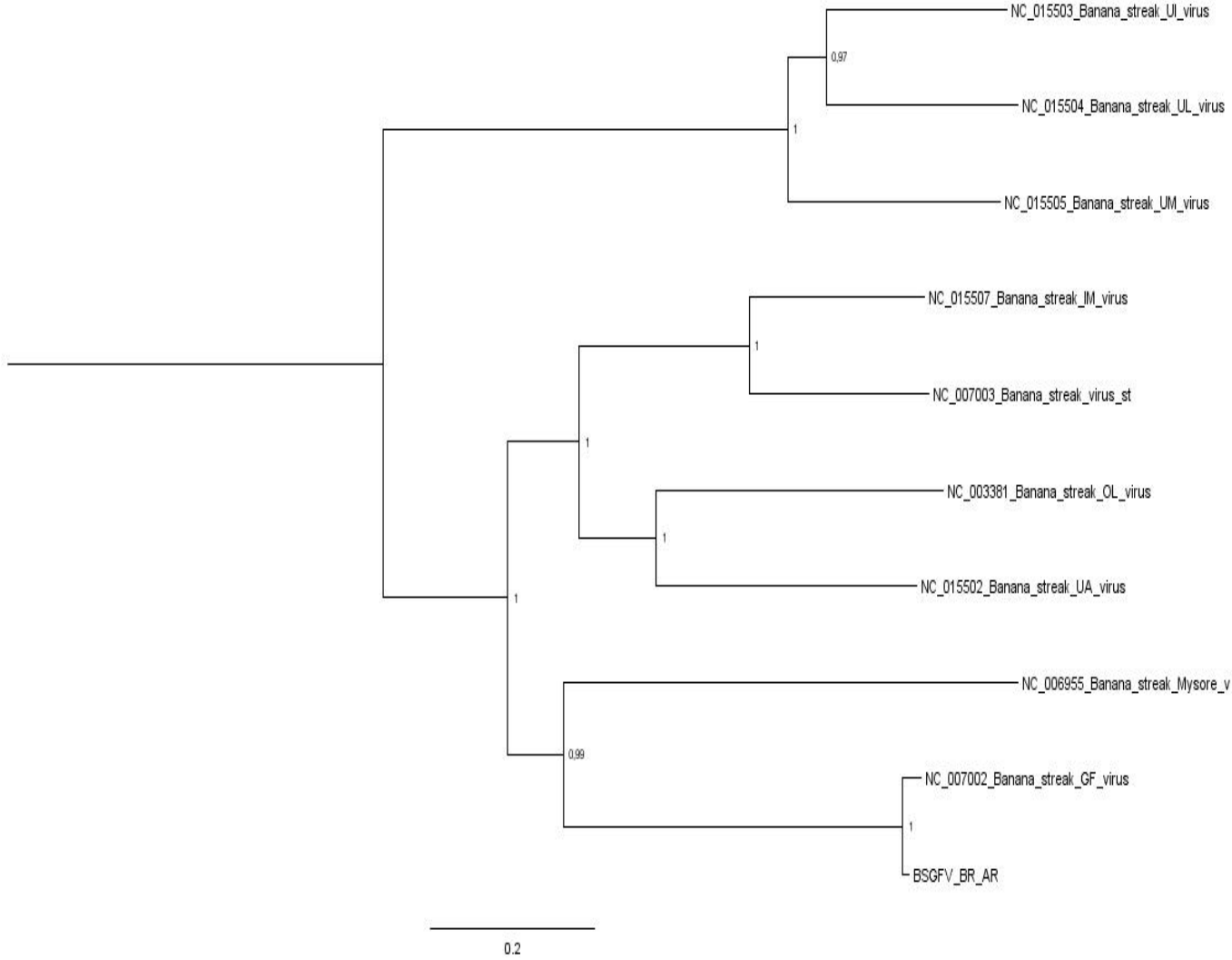
328328

329 **Figura3.** Porcentagem de identidade entre as sequencias de nucleotídeos da região RT-
330 RNaseH do isolado BSGFV_BR_ALPINIA detectado no Brasil e sequencias de vírus mais
331 estreitamente relacionados depositadas no GenBank.

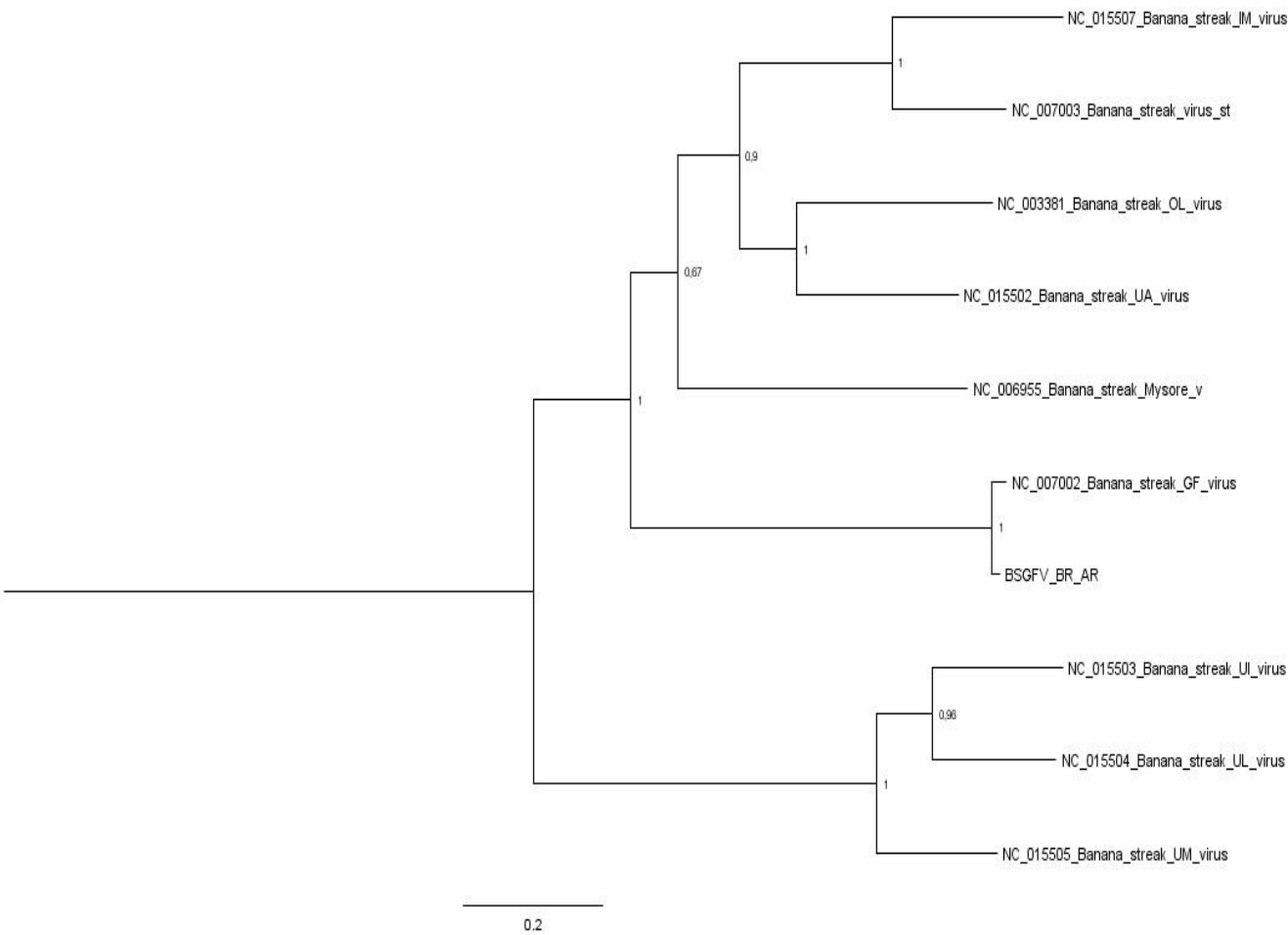
332 **Figura 4.** Análise filogenética de inferência Bayesiana baseada no genoma completo do isolado
333 BSFGV_BR_AR e outras sequencias referencias de badnavírus baixadas no NCBI-GenBank.

334334

335



336 **Figura 5.** Análise filogenética de inferência Bayesiana baseada na região RT do isolado
337 BSGFV_BR_AR e outras sequencias referencias de badnavírus baixadas no NCBI-GenBank.



338

339339

340340

341341

342342

343343

344 **Tabela Suplementar1.** Lista das sequencias referencias de badnavirus baixadas no NCBI-
 345 GenBank.

Espécie	Acrônimo	GenBank Acesso
<i>Badnavirus alphavirgamusae</i>	BSGFV	NC_007002
<i>Badnavirus betavirgamusae</i>	BSIMV	NC_015507
<i>Badnavirus gammavirgamusae</i>	BSMYV	NC_006955
<i>Badnavirus deltavirgamusae</i>	BSOLV	NC_003381
<i>Badnavirus epsilonvirgamusae</i>	BSUAV	NC_015502
<i>Badnavirus zetavirgamusae</i>	BSUIV	NC_015503
<i>Badnavirus etavirgamusae</i>	BSULV	NC_015504
<i>Badnavirus thetavirgamusae</i>	BSUMV	NC_015505
<i>Badnavirus iotavirgamusae</i>	BSVNV	NC_007003

346346

347347

348348