

Detecção molecular de viroses em inhame cultivado no Recôncavo da Bahia

¹ Danilo Pereira Costa, ² Paulo Ernesto Meissner Filho, ¹ Sebastião de Oliveira e Silva

¹ Universidade do Recôncavo da Bahia, Rua Rui Barbosa, 710 - Centro, CEP 44380-000 ,Cruz das Almas , BA, Brasil. E-mails: danilocosta_1739@hotmail.com, ssilva3000@gamil.com

² Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, Rua Embrapa s/n, CEP 44380-000, Cruz das Almas, BA, Brasil. E-mail: paulo.meissner@embrapa.br

Resumo: O inhame (*Dioscorea rotundata*) pode ser afetado por diversas viroses, dentre elas, viroses do gênero *Badnavirus* e o *Potyvirus*, considerados os mais importantes, devido a sua alta incidência e potencial para causar perdas na produção. O objetivo deste trabalho foi diagnosticar as viroses presentes em inhame cultivado no Recôncavo da Bahia. Foram coletadas túberas de 40 plantas com e sem sintomas de viroses nos municípios de São Felipe, Maragogipe, São Félix e Cruz das Almas. Para a detecção do *Badnavirus*, o DNA total foi extraído, realizando-se, em seguida, as reações de RCA e PCR com primers degenerados. O RNA foi extraído das amostras e usado na reação de RT-PCR com primers específicos para o *Yam mosaic virus* (YMV) e *Yam mild mosaic virus* (YMMV). Para *Badnavirus* detectou-se uma banda de 580 pb. Na reação de RT-PCR obteve-se um fragmento de 586 pb com primers específicos para o YMV, sendo que o YMMV não foi detectado em nenhuma das amostras analisadas. Os fragmentos genômicos obtidos foram sequenciados e comparados com as sequências do GenBank, apresentando 87 a 99% de identidade com *Badnavirus* e 84 a 99% com as sequências disponíveis para isolados de YMV.

Palavras chave: *Dioscorea sp*, Vírus, PCR.

Molecular detection of viruses in yam cultivated in the Bahia Recôncavo

Abstract: The yam (*Dioscorea rotundata*) may be affected by various viruses, among them, gender *Badnavirus* and *Potyvirus*, considered the most important because of its high incidence and potential to cause losses in production. The objective of this study was to detect virus present in yam cultivated in Recôncavo of Bahia. Tubers from 40 plants with and without symptoms of virus were collected in the municipalities of São Felipe, Maragogipe, São Felix and Cruz das Almas. For detection of *Badnavirus*, total DNA was extracted followed by RCA and PCR reactions using degenerate primers. RNA total extraction followed by RT-PCR reaction with specific primers were used to detect *Yam mosaic virus* (YMV) and *Yam mild mosaic virus* (YMMV). For *Badnavirus* a 580 bp band was detected. In YMV RT- PCR, a 586 bp fragment was obtained. The YMMV was not detected in the assessed samples. The genomic fragments were sequenced and showed high identities with isolates from *Badnavirus* and YMV.

Key words: *Dioscorea sp.*, Virus, PCR.

Introdução

O inhame (*Dioscorea* sp.) é uma planta trepadeira, monocotiledônea da família *Dioscoreaceae*, que possui mais de 600 espécies descritas, destacando-se *D. rotundata* Poir., *D. alata* L., *D. cayennensis* Lam., *D. esculenta* (Lour.) Burk. e *D. trifida* L. por produzirem túberas comestíveis (Moura et al., 2006, Eni et al., 2008 & Johne et al., 2009).

São cultivadas no mundo cerca de 4,7 milhões de hectares de inhame, que geram 49,2 milhões de toneladas de túberas. O Continente Africano é o maior produtor de *Dioscorea* e responde por 96% da produção mundial, segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística [IBGE] (2010) e a Food and Agriculture Organization [FAO] (2012). As espécies mais cultivadas no Brasil são a *D. alata* e a *D. rotundata* e o Nordeste é região maior produtora, onde a cultura tem grande importância sócio-econômica no cenário da agricultura familiar. Na Bahia, as principais áreas produtoras concentram-se na região do Recôncavo, destacando-se os municípios de São Felipe, Maragojipe, São Félix e Cruz das Almas (Gayral et al., 2009 & Santos, 2002). A presença de viroses nas túberas, sementes e principalmente na cultura, constitui-se em um dos principais fatores limitantes para a produção de inhame no mundo (Oliveira et al., 2006 & Silva et al., 2012).

Foram relatados em inhame vírus dos gêneros *Potyvirus*, *Badnavirus*, *Potexvirus*, *Maculavirus*, *Comovirus* e *Cucumovirus*. Destacam-se pela importância e distribuição geográfica, espécies dos gêneros *Potyvirus* e *Badnavirus* (Odu et al., 2006 & Yang et al., 2003).

As partículas virais do gênero *Potyvirus* são não-envelopadas, flexuosas e de forma cilíndrica, relatado com 680 nm a 900 nm de comprimento e 11 nm a 15 nm de largura. O seu genoma é constituído por ssRNA+, com cerca de 10 Kb, apresenta uma proteína denominada VPg (viral protein, genomelinked) ligada covalentemente ao seu terminal 5' e uma cauda poli-A no terminal 3" (Silva et al., 2012).

Na família *Caulimoviridae* o *Badnavirus* é o mais numeroso e apresenta partículas baciliformes com 95 - 130 nm de comprimento e 24 - 35 nm de largura, possui DNA circular de fita

dupla com cerca de 7,2 a 7,8 Kb (Fauquet et al., 2005).

No inhame os vírus podem ser transmitidos por vetores (insetos, ácaros, nematóides, afídeos, cochonilhas e fungos), material propagativo infectado, assim como por (danos mecânicos e contato entre as folhas de diferentes plantas e pelo próprio homem, através de instrumentos contaminados (Odu et al., 2006).

Os sintomas associados com viroses variam dependendo do agente envolvido, mas em geral incluem: clorose foliar severa, mosaico, cordão-de-sapato, clareamento das nervuras, clorose internerval, nanismo e distorção foliar. As viroses afetam a capacidade fotossintética das plantas, reduz sua produção, a qualidade das túberas e em algumas situações causa até a morte das plantas (Andrade et al., 2006, James et al., 2011 & Medberry et al., 1990).

Esse trabalho teve como objetivo, diagnosticar as viroses presentes e predominantes em inhame cultivado no Recôncavo da Bahia e com essa informação contribuir para o estabelecimento futuro de medidas para seu controle.

Material e métodos

Material vegetal

Em área de produtores de inhame foram selecionadas plantas, com idade de seis a sete meses, que apresentavam sintomas característicos da infecção por viroses (clorose foliar, mosaico, clareamento das nervuras e distorção na folha) e plantas sem sintomas. Foram coletadas túberas de 40 plantas de inhame provenientes de quatro locais, sendo 15 amostras da zona rural de Cruz das Almas (cinco amostras de Toá, cinco de Combê e cinco amostras de Três Bocas), 10 amostras de Maragojipe, 10 amostras de São Felipe e cinco amostras de São Félix.

As túberas coletadas após germinação, foram plantadas em sacos de polietileno contendo 60% de terra vegetal e 40% de adubo bovino em casa-de-vegetação e suas folhas usadas no testes para detecção de vírus.

Detecção molecular de *Badnavirus*

Na análise para *Badnavirus* a extração de DNA foi realizada com base no protocolo de Kamal Sharma et al. (2008), adaptado, no qual foram utilizados 10.000 g por 10 minutos em todas as centrifugações.

Para o RCA (Rolling Circle Amplification) foram usados 3 µL de DNA (50 ng), 1 µL de tampão NEB 10 X do kit biolab, 2 µL de BSA (10 mM), 1 µL dNTP (10 mM), 2 µL primer randômico de seis bases (5 mM), em seguida, levado para banho-maria a 95 °C por três minutos e depois a 4 °C por dois minutos. Depois adicionou 0,2 µL da enzima Phi29 DNA polimerase (GE Healthcare). Em seguida, a reação foi incubada a 30 °C por 24 horas, com desnaturação a 65 °C por 10 minutos (JOHNE et al., 2009).

Na PCR foram usados 2 µL do DNA com massa total em cada reação de 50 ng, 2,5 µL tampão buffer 10X da Taq, 1,2 µL MgCl₂ (50 mM), 1 µL de cada par de primers (10 mM) Badna FP (ATGCCITTYGGIITIAARAAYGCICC) e Badna RP (CCAYTTRCAIACISCICCCCAICC), 0,2 µL de Taq Polimerase (0,2 U) (Invitrogen), 1 µL de dNTP (10 mM) e 16,1 µL de água (YANG et al., 2003).

Esta reação foi levada ao termociclador com o seguinte programa: 94 °C por três minutos, 94 °C por 30 segundos, 65 °C por 30 segundos, 72 °C por 1,5 minutos, 72 °C por 10 minutos e 4 °C/∞ em 35 ciclos (Andrade et al., 2006).

O produto da PCR foi analisado em gel de agarose a 1%, em tampão TBE (Tris-Borato, EDTA 0,5 M pH 8,0) a 80 V por uma hora. Como controle positivo foi utilizado uma amostra cujo produto da PCR havia sido sequenciado e apresentado alta homologia com *Badnavirus*.

Detecção molecular de *Potyvirus*

Para a extração de RNA das plantas de inhame foi utilizada a metodologia de Gambino et al. (2008) para extração, onde foram utilizados 100 mg de amostra e após a incubação realizou-se uma centrifugação de 15.500 g por 20 minutos.

No RT-PCR, adicionou-se a cada tubo 13 µL de RNA total (10 ng), 1 µL de oligo dT (10 mM) e 1 µL do *primer* randômico hexâmero (10 mM) que foi incubado por cinco minutos a 70 °C e, em seguida, dois minutos a 4 °C. Em seguida, adicionou-se 5 µL da M-MLV buffer 5X, 1 µL de dNTP (10 mM), 1 µL RNase out, 1 µL da enzima M-MLV (1 U) e 2 µL de água tratada com DEPC,

de acordo com o kit da M-MLV (Promega).

Entretanto, para a detecção do YMV utilizou-se 2 µL do cDNA, 2,5 µL tampão buffer 10X do kit Invitrogen, 1,2 µL MgCl₂ (50 mM), 1 µL de cada par de primers específicos (10 mM) (YMV CP 1F - ATCCGGGATGTGGACAATGA e YMV UTR 1R - TGGTCCTCCGCCACATCAAA), 0,2 µL de Taq Polimerase (0,2 U), 1 µL de dNTP (10 mM) e 16,1 µL de água (MUMFORD; SEAL, 1997). Para o YMMV foi usado 2 µL do cDNA, 2,5 µL tampão buffer 10X do kit Invitrogen, 1,2 µL MgCl₂ (50 mM), 1 µL de cada par de primers específicos (10 mM) (YMMV CP 2F - GGCACACATGCAAATGAAAGC e YMMV UTR 1R - CACCAGTAGAGTGAACATAG), 0,2 µL de Taq Polimerase (0,2 U), 1 µL de dNTP (10 mM) e 16,1 µL de água (MUMFORD; SEAL, 1997).

A PCR para o YMV foi realizada com as seguintes condições de amplificação: 3 min a 94 °C, seguido de 35 ciclos de 30 s a 94 °C, 30 s a 55 °C, 1,5 min a 72 °C, com uma extensão final de 10 min a 72 °C. Para os YMMV as condições foram às seguintes: 3 min a 92 °C, seguido de 35 ciclos de 30 s a 94°C, 55°C a 30 s, 1,5 min a 72 °C, com uma extensão final de 10 min a 72 °C. As amostras foram amplificadas em termociclador PTC100 (MJ Research) e os fragmentos de DNA visualizados em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídeo, sob luz ultravioleta segundo Yang et al. (2003), com adaptações. O controle positivo para o YMV foi obtido de amostra sintomática, que após a PCR foi sequenciada pela Macrogen Inc. (Seul, Coréia do Sul), tendo apresentando alta identidade com o YMV.

Sequenciamento e análise filogenética

Os produtos obtidos na PCR para o *Badnavirus* e para o YMV foram purificados utilizando o kit Gel Band Purification (GE Healthcare). O sequenciamento foi realizado pela Macrogen Inc. (Seul, Coréia do Sul) diretamente dos produtos de PCR purificados. Foram utilizadas para o sequenciamento três amostras de YMV e uma amostra de *Badnavirus*. As sequências de nucleotídeos foram inicialmente submetidas ao programa Seqassem (www.sequentix.de/software_seqassem.1.0_free), para alinhamento e montagem dos fragmentos amplificados e o uso da ferramenta do Blastn (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), para a pesquisa de identidade das espécies com base

no nível limite de 85% para o *Badnavirus* e 80% para o YMV para sequências de nucleotídeos estabelecido pelo Comitê Internacional de Taxonomia Viral - International Committee on Taxonomy of viruses [ICTV] (Fauquet et al., 2005 & ICTV, 2012). As sequências foram alinhadas utilizando o programa Clustal W (www.ebi.ac.uk/Clustalw) e submetidas à análise de máxima verossimilhança, que foi conduzida no programa MEGA 5.1 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis), “bootstrapping” de 10.000 repetições, e método Kimura 2 – parâmetros, Pairwise deletion (Tamura et al., 2011).

Resultados e discussão

Diagnose e análise das sequências do *Badnavirus*

Com os primers BADNA FP/BADNA RP foi possível a amplificação de fragmentos com tamanho de aproximadamente 580 pb em todas as amostras de folhas de inhame (Figura 1 A e B), o que pode evidenciar a presença de *Badnavirus* no Inhame da Costa cultivado nos

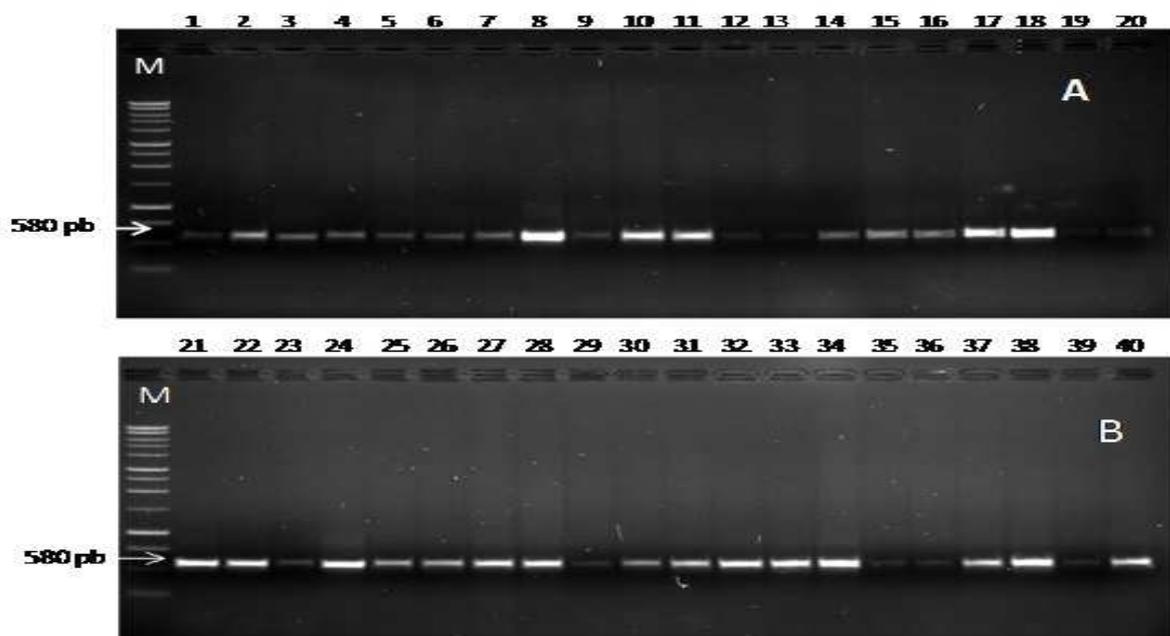
municípios produtores do Recôncavo da Bahia.

Em trabalhos anteriores *Badnavirus* foi também encontrado em plantas de *Dioscorea* cultivadas no Nordeste (Edgar, 2004 & Andrade et al., 2006). A presença dessa virose em todas as amostras analisadas no presente estudo deve-se provavelmente à proximidade geográfica das áreas amostradas e a constante troca de túberas sementes, sem nenhum controle fitossanitário, entre os agricultores, inclusive de outros estados como Paraíba e Pernambuco, o que pode acarretar a disseminação desse vírus.

Na comparação da sequência deste *Badnavirus* com as disponíveis no GenBank, observou-se uma identidade nucleotídica de 90 a 92% com os isolados do *Dioscorea bacilliform virus* - DBV.

Atualmente, os critérios adotados pelo ICTV para a delimitação de novas espécies dentro do gênero *Badnavirus*, baseiam-se em identidade inferior a 80% na sequência de aminoácidos do gene de domínio da RT-RNA H e inferior a 85% de identidade na sequência de nucleotídeos do genoma completo (ICTV, 2012).

Figura 1. A e B- Padrão eletroforético em gel de agarose a 1% com os amplicons obtidos a partir das amostras de DNA total extraídas de 40 amostras foliares de diferentes plantas de inhame. **M:** marcador (1 Kb DNA ladder); **1 a 40:** Amostras de inhame coletadas no Recôncavo da Bahia e avaliadas para presença de *Badnavirus*, sendo a amostra 24 o controle positivo.



A sequência de nucleotídeos analisada apresentou na análise de máxima verossimilhança, alta variabilidade genética, com identidade entre os isolados variando de 87 a 99% quando comparadas as amostras do GenBank. Tais análises resultaram em árvores com topologias semelhantes (*Badnavirus*), apresentando um ramo monofilético significativamente suportado pelos valores de *bootstrap*. As sequências dos *Badnavirus* disponíveis no Genbank formaram dois

agrupamentos, sendo o Grupo 1 constituído por 23 sequências com as espécies *Dioscorea rotundata endogenous virus* (DREV), *Dioscorea bacilliform virus* (DaBV) e *Dioscorea bacilliform virus A* (DBVA) e o Grupo 2 por seis sequências das espécies de *Dioscorea bacilliform virus* (DaBV), *Banana streak virus* (BSV), *Commelina yellow mottle virus* (CoYMV), *Citrus yellow mosaic virus* (CyMV), *Piper yellow mottle virus* (PYMV) e *Taro bacilliform virus* (TBV) (Figura 2).

Figura 2 - Árvore de máxima verossimilhança baseada nas sequências parciais de *Badnavirus* em estudo e nas sequências de *Badnavirus* depositadas no GenBank (Tabela 1).

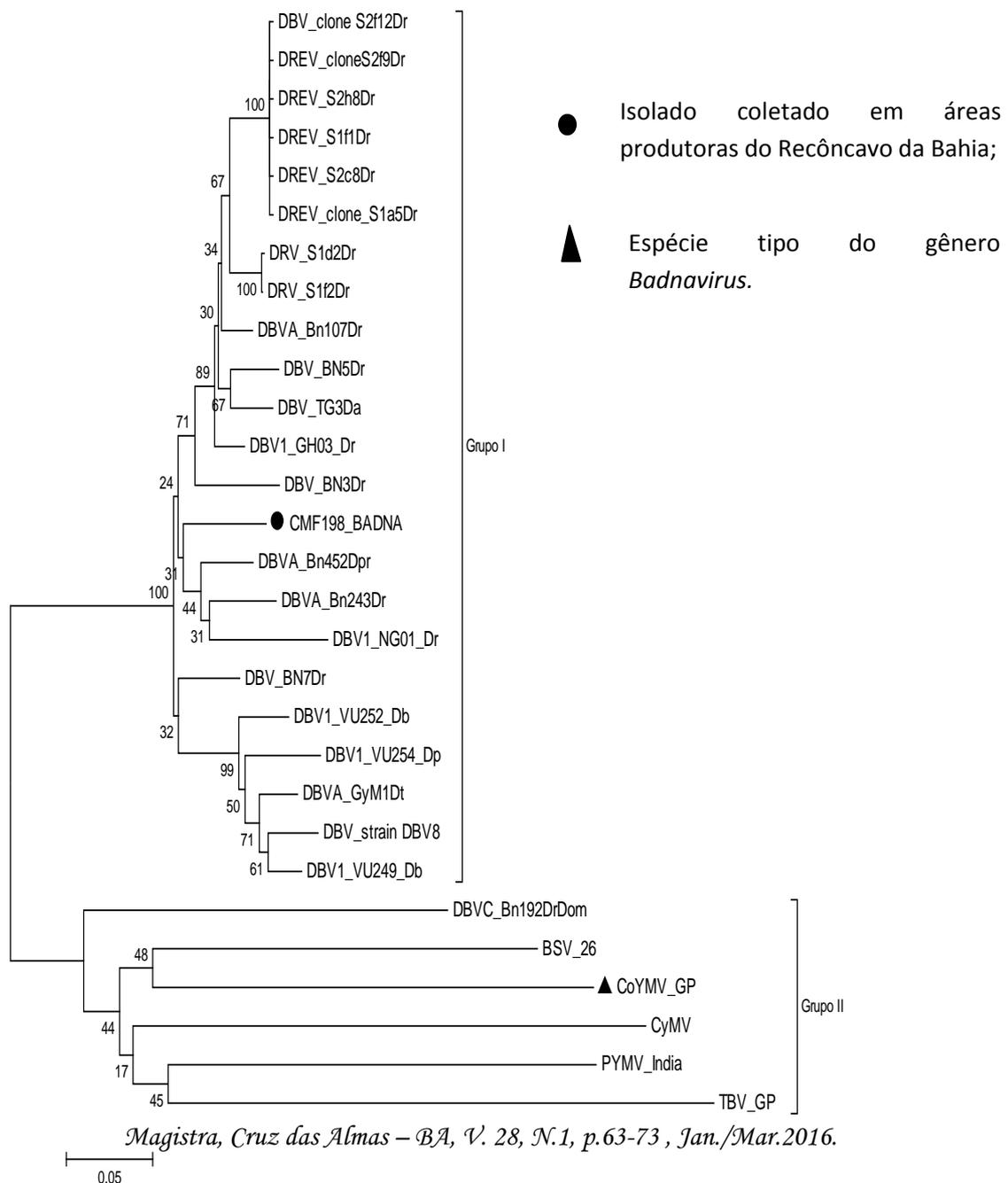


Tabela 1- Informações de cada acesso utilizado na árvore filogenética para *Badnavirus*.

Acesso	Espécie	Hospedeiro	Sigla
AM072664.1	<i>Dioscoreabacilliformvirus</i>	Inhame	DBV_GH03_Dr
KF829965.1	<i>Dioscorearotundata endogenous virus</i>	Inhame	DREV_S1d2Dr
KF829971.1	<i>Dioscorearotundata endogenous virus</i>	Inhame	DREV_S1f2Dr
AM944587.1	<i>Dioscorea bacilliform virus</i>	Inhame	DBV_BN5Dr
AM944589.1	<i>Dioscorea bacilliform virus</i>	Inhame	DBV_BN7Dr
AM944585.1	<i>Dioscorea bacilliform virus</i>	Inhame	DBV_BN3Dr
AM944581.1	<i>Dioscorea bacilliform virus</i>	Inhame	DBV_TG3Da
KF829952.1	<i>Dioscorea bacilliform virus</i>	Inhame	DBV_DBV8
EF466073.1	<i>Dioscorea bacilliform virus</i>	Inhame	DBV_Bn107Dr
KF829957.1	<i>Dioscorearotundata endogenous virus</i>	Inhame	DREV_S1a5Dr
KF829996.1	<i>Dioscorearotundata endogenous virus</i>	Inhame	DREV_S2h8Dr
KF829995.1	<i>Dioscorearotundata endogenous virus</i>	Inhame	DREV_S2f12Dr
KF829994.1	<i>Dioscorearotundata endogenous virus</i>	Inhame	DREV_S2f9Dr
KF829988.1	<i>Dioscorearotundata endogenous virus</i>	Inhame	DREV_S2c8Dr
KF829970.1	<i>Dioscorearotundataendogenousvirus</i>	Inhame	DREV_S1f1Dr
EF466087.1	<i>Dioscorea bacilliform virus C</i>	Inhame	DBVC_Bn192DrDom
EF466076.1	<i>Dioscorea bacilliform virus A</i>	Inhame	DBVA_Bn452Dpr
EF466074.1	<i>Dioscorea bacilliform virus A</i>	Inhame	DBVA_Bn243Dr
EF466081.1	<i>Dioscorea bacilliform virus A</i>	Inhame	DBVA_GyM1Dt
DQ836237.1	<i>Piper yellow mottle virus</i>	Pimenta	Pymv_poliproteína
FJ594904.1	<i>Banana streakvirus</i>	Banana	BSV_26
AM072673.1	<i>Dioscorea bacilliform virus</i>	Inhame	DBV_NG01_Dr
AM072706.1	<i>Dioscorea bacilliform virus 1</i>	Inhame	DBV_VU252
AM072707.1	<i>Dioscorea bacilliform virus 1</i>	Inhame	DBVA_VU254_Dp
AM072705.1	<i>Dioscorea bacilliform virus</i>	Inhame	DBV_VU249_Db
AJ305449.1	<i>Yam mosaic vírus</i>	Inhame	YMV_DrCDI1
AJ305450.1	<i>Yam mosaic vírus</i>	Inhame	YMV_DrBen3
AJ305453.1	<i>Yam mosaic vírus</i>	Inhame	YMV_DaCDI17
NC_004039.1	<i>Potato virus A poty</i>	Inhame	PVA
NC_001616.1	<i>Potato virus Y poty</i>	Inhame	PVY
NC_001785.1	<i>Papaya ring spot virus poty</i>	Inhame	PRSV

Foi possível observar no Agrupamento Filogenético 1, que o isolado CMF 198_BADNA, detectado e sequenciado nesse trabalho, está mais próximo do DBVA (isolados Bn452Dpr - EF466076.1 e Bn243Dr - EF466074.1) e DaBV1 (isolado_NG01_Dr - AM072673.1).

Portanto, com esses resultados, confirmou-se que o isolado em estudo trata-se de um *Badnavirus*, o que corroboram com os resultados publicados por Lima et al. (2013) que consideraram os *Badnavirus* como uma das espécies mais destrutivas de vírus para o produtor de inhame, que causa redução na produção.

Para a demarcação de espécies do gênero *Badnavirus* foram feitas comparações com as sequências disponíveis no GenBank (Harper et al., 2005). Nessas análises os isolados e espécies de *Badnavirus* foram divididos em dois grupos, Grupo 1 em que o isolado em estudo agrupa com DaBV, DBVA e DREV, no qual a PASC (Pairwise sequence comparison) mostrou alta identidade de sequências (90 a 92%) e Grupo II, em que as espécies de *Badnavirus* analisadas agrupam com a espécie tipo.

Kenyon et al. (2008) encontraram vários grupos divergentes de sequências de *Badnavirus* referentes à região RT/RNaseH em amostras de inhame no Sul do Pacífico, utilizando os mesmos

pares de oligonucleotídeos utilizados nesse estudo. Isto evidencia a alta identidade entre sequências do mesmo grupo, presença de deleções de aminoácidos e ORFs não funcionais.

Diagnose e análise das sequências do YMV

No RT-PCR para *Potyvirus* todas as amostras analisadas foram ajustadas para concentração de $10 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$, utilizando-se a temperatura de anelamento de $50 \text{ }^\circ\text{C}$ para o YMMV e de $55 \text{ }^\circ\text{C}$ para o YMV.

Após ajustar as concentrações de RNA e temperaturas de anelamento para a detecção dos vírus, foram analisadas as 40 amostras. Por meio da RT-PCR com os primers (YMV CP 1F e UTR 1R) (Mumford & Seal, 1997) foi obtido um fragmento de aproximadamente 586 pares de bases (pb), o que indica a presença de YMV em todas as amostras (Figura 3 A e B). Esses resultados são semelhantes aos obtidos por Andrade et al. (2006) nas análises para YMV em inhame em Alagoas, Pernambuco e na Paraíba.

As sequências obtidas dos amplicons na PCR para o YMV, nas amostras 266 e 267, apresentaram 99% de identidade comparada entre si, enquanto a amostra 266 em relação a 268 apresentou 97% de identidade, e todas apresentaram alta identidade com o gene da capa protéica do YMV (Figura 4).

Figura 3. A e B- Padrão eletroforético em gel de agarose (1%) de amplicons obtidos a partir de amostras de RNA total, extraídas de folhas de inhame e avaliadas para a presença de *Yam mosaic virus* (YMV). **M:** Marcador (1 Kb DNA ladder); **1 a 40:** amostras de inhame coletadas no Recôncavo da Bahia, utilizando concentração de $10 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ de RNA no RT-PCR com temperatura de anelamento de 55°C .

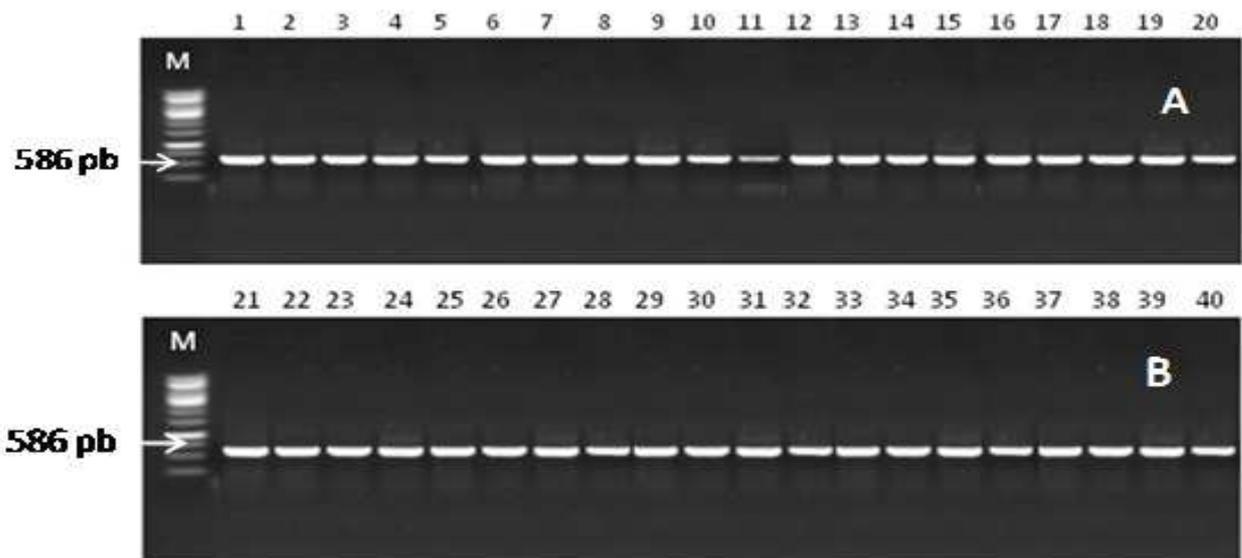


Figura 4- Árvore de máxima verossimilhança baseada nas sequências parciais da região da capa protéica (região 3' UTR) do *Yam mosaic vírus* (YMV) e sequências de *Potyvirus* depositadas no GenBank, comparando os grupos formados com o vírus tipo e com isolados do YMV (Tabela 2).

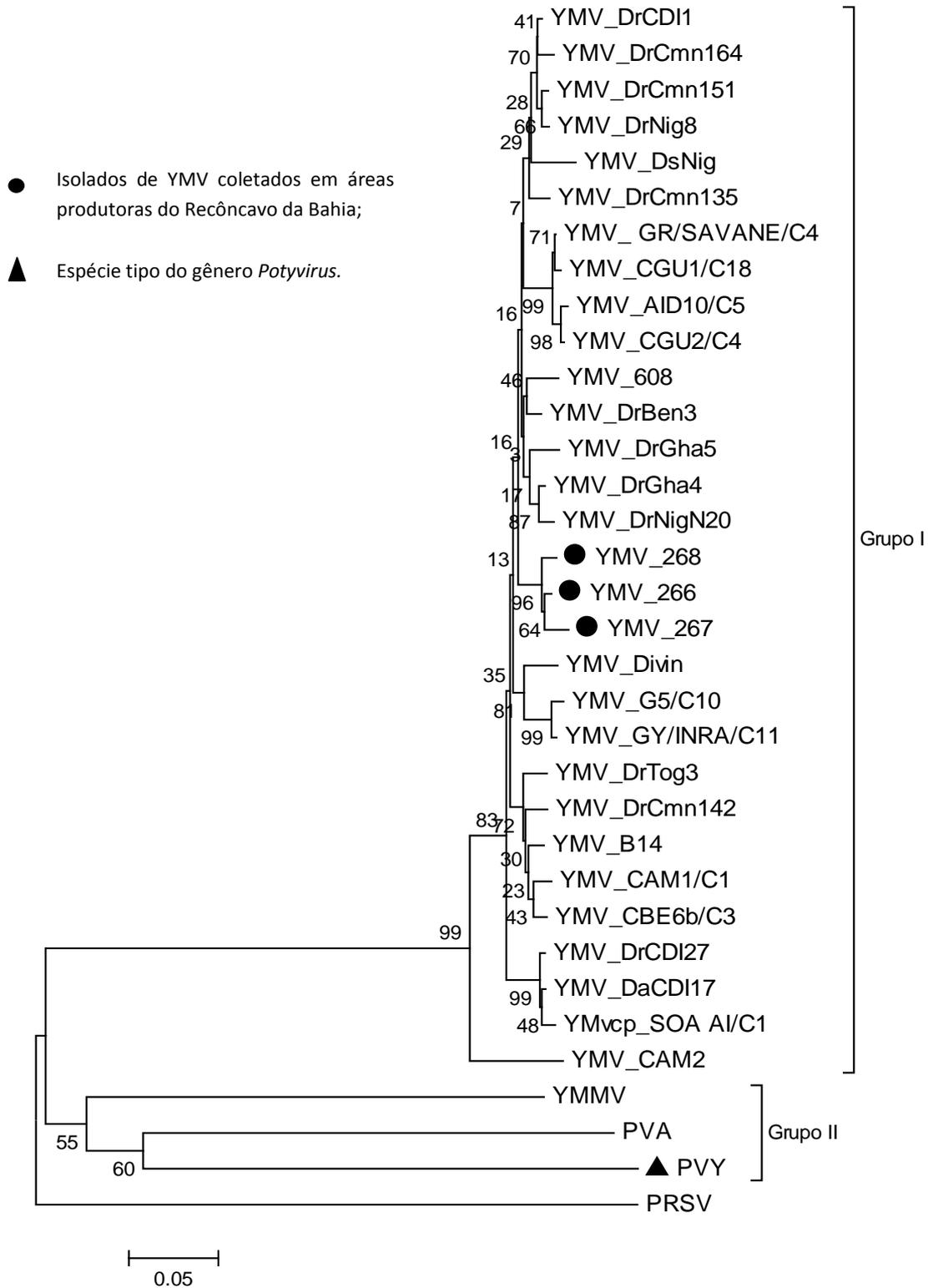


Tabela 2- Informações de cada acesso utilizado na árvore filogenética para *Potyvirus*.

Acesso	Espécie	Hospedeiro	Sigla
NC_019412.1	<i>Yam mild mosaic virus from Brazil</i>	Inhame	YMMV
AJ244042.1	<i>Yam mosaic virus</i>	Inhame	YMV_CAM2
AJ244043.1	<i>Yam mosaic virus</i>	Inhame	YMV_AID10/C5
AJ244044.1	<i>Yam mosaic virus</i>	Inhame	YMV_CGU2/C4
AJ244045.1	<i>Yam mosaic virus</i>	Inhame	YMV_GY/INRA/C11
AJ244047.1	<i>Yam mosaic virus</i>	Inhame	YMV_608
AJ244049.1	<i>Yam mosaic virus</i>	Inhame	YMV_B14
AJ244054.1	<i>Yam mosaic virus</i>	Inhame	YMV_CAM1/C1
AJ244056.1	<i>Yam mosaic virus</i>	Inhame	YMV_CBE6b/C3
AJ244057.1	<i>Yam mosaic virus</i>	Inhame	YMV_CGU1/C18
AJ244060.1	<i>Yam mosaic virus</i>	Inhame	YMV_Divin
AJ244062.1	<i>Yam mosaic virus</i>	Inhame	YMV_G5/C10
AJ244063.1	<i>Yam mosaic virus</i>	Inhame	YMV_GR/SAVANE/C4
AJ244065.1	<i>Yam mosaic virus</i>	Inhame	YMvcp_SOA AI/C1
AJ305436.1	<i>Yam mosaic virus</i>	Inhame	YMV_DrGha4
AJ305437.1	<i>Yam mosaic virus</i>	Inhame	YMV_DrGha5
AJ305439.1	<i>Yam mosaic virus</i>	Inhame	YMV_DrNig8
AJ305440.1	<i>Yam mosaic virus</i>	Inhame	YMV_DrNigN20
AJ305441.1	<i>Yam mosaic virus</i>	Inhame	YMV_DsNig
AJ305442.1	<i>Yam mosaic virus</i>	Inhame	YMV_DrTog3
AJ305443.1	<i>Yam mosaic virus</i>	Inhame	YMV_DrNigN5
AJ305444.1	<i>Yam mosaic virus</i>	Inhame	DrCmn164
AJ305445.1	<i>Yam mosaic virus</i>	Inhame	YMV_DrCmn151
AJ305446.1	<i>Yam mosaic virus</i>	Inhame	YMV_DrCmn142
AJ305447.1	<i>Yam mosaic virus</i>	Inhame	YMV_DrCmn135
AJ305448.1	<i>Yam mosaic virus</i>	Inhame	YMV_DrCDI27
AJ305449.1	<i>Yam mosaic virus</i>	Inhame	YMV_DrCDI1
AJ305450.1	<i>Yam mosaic virus</i>	Inhame	YMV_DrBen3
AJ305453.1	<i>Yam mosaic virus</i>	Inhame	YMV_DaCDI17
NC_004039.1	<i>Potato virus A</i>	Batata	PVA
NC_001616.1	<i>Potato virus Y</i>	Batata	PVY
NC_001785.1	<i>Papaya ring spot virus</i>	Mamão	PRSV

Nas análises de nucleotídeos observou-se que as sequências de Potyvirus disponíveis no GenBank, formaram dois grupos bem distintos: No Grupo I foi agrupado o YMV, que apresentou alta identidade de sequências (88 a 97%) na comparação das amostras com aquelas disponíveis no GenBank. Enquanto o Grupo II comportou-se como divergente (55 a 60% de identidade) (Figura 4) agrupando a espécie tipo de *Potyvirus* e outros *Potyvirus*, como o *Yam mild mosaic virus* (YMMV), *Potato virus A* (PVA), *Papaya ring spot virus* (PRSV).

Os acessos YMV 266, YMV 267 e YMV 268 apresentaram alta identidade com os isolados de YMV disponíveis no GenBank, formando um grupo com 99% de identidade entre eles, se comparados com o Grupo II (YMMV, PVA e PVY) contendo a espécie tipo de Potyvirus a espécie apresentando 55% de identidade.

Para definir as estratégias mais adequadas para o controle de viroses é necessário em primeiro lugar saber as viroses que estão presentes na região ou no plantio em análise. Nesse trabalho foram detectados o YMV, que na natureza é transmitido por pulgões de forma não circulativa (Thouvenel & Fauquet, 1979) e um Badnavirus, que é transmitido por cochonilhas (Kenyon et al, 2008). Para o controle de viroses pode utilizar-se resistência genética, plantas geneticamente modificadas, medidas de exclusão, controle de vetores, erradicação de plantas infectadas, uso de sementes certificadas ou eliminação do vírus presente nas mudas pelo cultivo de meristemas (Hadidi et al., 2005).

A presença de mais de uma virose em uma mesma planta geralmente aumenta os danos causados por elas, porque pode haver um sinergismo de seus efeitos. No caso inhame, a ocorrência simultânea de um Badnavirus com um vírus de partículas flexuosas ocasionou manchas necróticas na parte interna das túberas (Kenyon et al., 2008).

Conclusões

Foi detectada a presença do *Yam mosaic virus* e de um *Badnavirus* em amostras obtidas de inhame no Recôncavo da Bahia.

No Recôncavo da Bahia, as plantas de inhame analisadas apresentavam infecção mista por *Badnavirus* e pelo YMV.

Referências

- Andrade, G.P., Silva, A.K.S., Filloux, D., Pio-Ribeiro, G., Kitajima, E.W., & Xavier, D.M. (2006). Plantas de *Dioscorea alata* infectada com YMMV no estado de Pernambuco. *Fitopatologia Brasileira*, 31, 344.
- Edgar, R.C. (2004). Muscle: A multiple sequence alignment method with reduced time and space complexity. *BMC Bioinformatics*, 5, 1-19.
- Eni, A.O., Hughes J. D. A., & Rey, M.E.C. (2008). Survey of the incidence and distribution of five viruses infecting yams in the major yam-producing zones in Benin. *Annals of Applied Biology*, 153, 223-232.
- Food and Agriculture Organization. (2012). *Faostat*. Recuperado em 19 setembro, 2014, de <http://faostat.fao.org/site/567/default.aspx#ancor>.
- Fauquet, C., Mayo, M., Maniloff, J., Desselberger, U., & Ball, L. (Eds.). (2005). *Virus taxonomy: Eighth Report of the International committee on Taxonomy of Viruses* (1269p). London: Elsevier/ Academic Press.
- Gambino, G., Perrone, I., & Gribaudo, I.A. (2008). Rapid and Effective Method for RNA Extraction from Different Tissues of Grapevine and Other Woody Plants, *Phytochemical Analysis*. 19, 520-525.
- Gayral, P., & Iskra-Caruana, M. (2009). Phylogeny of Banana streak virus reveals recent and repetitive endogenization in the genome of its host (*Musa* sp.). *Journal of Molecular Evolution*, 69, 65-80.
- Hadidi, A., Khetarpal, R. K. K., & Koganezawa, H. (2005). *Plant virus disease control* (684p). St. Paul: APS Press.
- Harper, G., Hart, D., Moulton, S., Hull, R., Geering, A., & Thomas, J. (2005). The diversity of Banana streak virus isolates in Uganda. *Archives of Virology*, 150, 2407-2420.

- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. (2010) *Produção de inhame*. Recuperado em 23 fevereiro, 2014, de <http://www.ibge.org.br>.
- International Committee on Taxonomy of viruses. Taxonomy of family *Caulimoviridae* and *Potyviridae*. Recuperado em setembro, 2014, de <http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp?version=2012>.
- James, A.P., Geijskes, R.J., Dale, J.L., & Harding, R.M. (2011). Development of a Novel Rolling-Circle Amplification Technique to Detect Banana streak virus that also Discriminates Between Integrated and Episomal Virus Sequences. *Plant Disease*, 95, 57-62.
- Johne, R., Müller, H., Rector, A., Van, R.M., & Stevens, H. (2009). Rolling-circle amplification of viral DNA genomes using phi29 polymerase. *Trends in Microbiology*, 17, 205-211.
- Kamal Sharma, K., Mishra, A.K., & Misra, S. (2008). A simple and efficient method for extraction of genomic DNA from tropical tuber crops. *African Journal of Biotechnology*, 7, 1018-1022.
- Kenyon, L., Lebas, B.S.M., & Seal, S.E. (2008). Yams (*Dioscorea* spp.) from the South Pacific Islands contain many novel badnaviruses: implications for international movement of yam germplasm. *Archives of Virology*, 53, 877-889.
- Lima, J.S., Lima, A.T.M., Catillo-Urquiza, G.P., Silva, S.J.C., Assunção, I.P., Michereff, S.J., Zerbini, M., & Lima, G.S.A. (2013). Variabilidade genética de isolados de badnavírus infectando inhame (*Dioscorea* spp.) no nordeste do Brasil. *Tropical Plant Pathology*, 38, 349-353.
- Medberry, S. L., Lockhart, B. E. L., & Olszewski, N. E. (1990). Properties of Commelina yellow mottle virus complete DNA sequence, genomic discontinuities and transcript suggest that it is a pararetrovirus. *Nucleic Acids Research*, 18, 5505-5513.
- Moura, R. M., Oliveira, I. S., & Torres, G. R. C. (2006). Primeiro Assinalamento de Scutellonemabradys em *Dioscorea alata* no Brasil, Estabelecido no Estado de São Paulo. *Fitopatologia Brasileira*, 31, 211-211.
- Mumford R., & Seal S. (1997). Rapid Single-tube immunocapture RT-PCR for the detection of two yam of potyviruses. *Jornal Virological Methods*. 69, 73-79.
- Odu, B. O., Asiedu, R., Shoyinka, S. A., & Hughes, J. D. A. (2006). Screening of water yam (*Dioscorea alata* L.) genotypes for reactions to viruses in Nigéria. *Journal of Phytopathology*, 154, 716-724.
- Oliveira, I.S, Luz, E., Bezerra, J.L., Mouza, R.M., Torres, G.R.C., & Maia, L.C. (2006). Severidade da podridão-verde em inhames e especialização fisiológica de *Penicillium sclerotigenum*. *Fitopatologia Brasileira*, 31, 094-098.
- Santos, E.S. (2002). *Cultura do inhame (Dioscorea spp.)* (9p). João Pessoa: EMEPA-PB, SEBRAE.
- Silva, J.A., Oliveira, A.P., Alves, G.S., Cavalcante, L.F., Oliveira, A.N.P., & Araújo, M.A.M. (2012). Rendimento do inhame adubado com esterco bovino e biofertilizante no solo e na folha. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, 16, 253-257.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., & Kumar, S. (2011). MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution*. 28, 2731-2739.
- Thouvenel, J. C., & Fauquet, C. (1979). Yam mosaic, a new potyvirus infecting *Dioscorea cayenensis* in the Ivory Coast. *Annals of Applied Biology*, 93, 279-283.
- Yang, I.C., Hafner, G.J., Revill, P.A., Dale, J.L., & Harding, R.M. (2003). Sequence diversity of South Pacific isolates of Taro bacilloform virus and the development of a PCR-based diagnostic test. *Archives of Virology*, 148, 1957-1968

Recebido em: 07/10/2014

Aceito em: 23/05/2016