

Otimização de protocolos para detecção molecular de viroses em inhame

¹Danilo Pereira Costa, ²Emanuel Felipe Medeiros Abreu, ²Paulo Ernesto Meissner Filho,
¹Sebastião de Oliveira e Silva

¹ Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas, Campus de Cruz das Almas, Rua Ruy Barbosa, 710, Centro, CEP 44380-000, Cruz das Almas, BA, Brasil. E-mails: danilocosta_1739@hotmail.com, ssilva3000@gmail.com

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

Resumo: A presença de sintomas de viroses é frequente nos plantios de inhame (*Dioscorea rotundata*) do Nordeste e constitui-se um dos fatores limitantes de produção. Mundialmente, já foram relatados na cultura, vírus dos gêneros *Badnavirus*, *Curtovirus*, *Potyvirus*. Destacam-se pela importância e distribuição geográfica, espécies dos gêneros *Badnavirus* e *Potyvirus*. O objetivo deste trabalho foi otimizar e tornar reprodutível protocolos para a detecção molecular de espécies dos gêneros *Badnavirus* e *Potyvirus* em inhame. Foram coletadas túberas de 40 plantas com e sem sintomas de viroses nos municípios de São Felipe, Maragogipe, São Félix e Cruz das Almas, Bahia. Para a detecção de *Badnavirus*, o DNA total foi extraído com base no protocolo de Kamal Sharma (2008) com modificações na quantidade de material vegetal processado, nas centrifugações, na concentração do DNA e na temperatura de anelamento no teste de PCR. Enquanto para *Potyvirus* (*Yam mosaic virus* - YMV e *Yam mild mosaic virus* - YMMV), o RNA foi extraído testando as seguintes metodologias: Kits de extração de RNA Total Axygen, Easyzol e protocolo de Gambino (2008), com modificações semelhantes às avaliadas no protocolo de extração de DNA. Para *Badnavirus* detectou-se uma banda de 580 pares de bases (pb). Na detecção de *Potyvirus*, obteve-se um fragmento de 586 pb com os primers para o YMV. O YMMV não foi detectado em nenhuma das amostras analisadas. Contudo, os protocolos que apresentaram melhores respostas para a extração de DNA e RNA foram Kamal Sharma (2008) e Gambino (2008), respectivamente. Os fragmentos genômicos obtidos foram sequenciados, apresentando alta homologia com *Badnavirus* e YMV.

Palavras chave: *Dioscorea rotundata*, Vírus, RCA-PCR, RT-PCR

Optimization of protocols for molecular detection of viruses in yam

Abstract: The presence of viruses constitutes one of the main limiting factors for the production of yam (*Dioscorea rotundata*) in Northeast. Worldwide, the virus of the genus *Badnavirus*, *Curtovirus*, *Potyvirus* have been reported in the crop which highlights the importance and geographical distribution of species of the genus *Potyvirus* and *Badnavirus*. The objective of this study was to optimize protocols and make it reproducible for molecular detection of these viruses in yam. Tubers were collected from 40 plants with and without symptoms of viruses in the municipalities of São Felipe, Maragogipe, São Félix and Cruz das Almas, Bahia. For detection of *Badnavirus*, total DNA was extracted based on the protocol Kamal Sharma (2008) modifying the quantity of plant material processed in centrifugations at the time of extraction, the concentration of genetic material and annealing temperature in PCR test. While for potyvirus (*Yam mosaic virus* - YMV and *Yam mild mosaic virus* - YMMV), RNA was extracted by testing the following methodologies: Total RNA Extraction Axygen, Easyzol kits and Gambino (2008), following the same modifications to the protocol DNA. For *Badnavirus* detected a band of 580 base pairs (bp). For *Potyvirus*, the YMV yielded a fragment of 586 basepairs (bp) with primers for YMV. The YMMV was not detected in any of the samples. However, the protocols that responded better to extract DNA and RNA were Kamal Sharma (2008) and Gambino (2008) sequences. The genomic fragments were sequenced, confirming the presence of *Badnavirus* and YMV.

Key words: *Dioscorea rotundata*, Vírus, RCA-PCR, RT-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 (Eni et al., 2008 & Johnne et al., 2009).

Em 2010 a região Nordeste foi responsável pela produção de 164.000 toneladas de inhame segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística [IBGE], (2010) e a Food and Agriculture Organization [FAO], (2012). Na Bahia, as principais áreas produtoras concentram-se na região do Recôncavo, destacando-se os municípios de São Felipe, Maragogipe, São Félix e Cruz das Almas. Embora seja considerada, uma cultura de subsistência, o inhame tem grande importância sócio-econômica no cenário da agricultura familiar no Nordeste do Brasil (Gayral et al., 2009). Entretanto, no seu cultivo emprega-se um baixo nível tecnológico e material de plantio de baixa qualidade genética e fitossanitária, o que resulta em produtividade reduzida. A presença de viroses nas túberas-sementes constitui-se em um dos principais fatores limitantes da produção de inhame no mundo (Oliveira et al., 2006 & Silva et al., 2012), uma vez que plantas provenientes dessas túberas-sementes infectadas terão comprometimento no seu metabolismo e desenvolvimento fenológico, e consequente diminuição da produtividade.

Foram relatados em países produtores (Holanda, Espanha, Reino Unido) de inhame diferentes espécies de vírus relacionados aos gêneros *Badnavirus*, *Comovirus*, *Cucumovirus*, *Curtovirus*, *Maculavirus*, *Potexvirus* e *Potyvirus*, cuja infecção resulta em sintomas como a clorose foliar, o mosaico, o clareamento das nervuras e a distorção no limbo, o que leva a redução irregular da atividade fotossintética e muitas vezes o aumento das taxas de senescência dos cloroplastos, induzindo à formação de açúcares redutores e armazenamento mínimo de amido, que resulta em perdas significativas na qualidade e quantidade de túberas (Thouvenel, Dumont, 1990, Moura, 2005, Odu et al., 2006 & Eni et al., 2008).

Entre as diferentes espécies de vírus de inhame relatadas até o presente momento no Brasil, destacam-se os vírus dos gêneros

Potyvirus e *Badnavirus*. As espécies de *Potyvirus* já encontradas no Brasil são o *Yam mild mosaic virus* (YMMV) e o *Yam mosaic virus* (YMV) (Silva et al., 2012 & Lima et al., 2013). O gênero *Badnavirus*, possui uma espécie predominante na cultura do inhame no Brasil, o *Dioscorea bacilliform virus* (DBV) (Medberry et al., 1990 & King et al., 2012).

O inhame por ser uma cultura propagada vegetativamente apresenta grande vulnerabilidade ao ataque de fitopatógenos como os vírus. O uso pelos agricultores de propágulos vegetativos infectados e introduções descontroladas de genótipos contendo alguns dos referidos vírus resultam numa ameaça a produtividade e sustentabilidade da cultura (Lima et al., 2013).

O desenvolvimento de um método diagnóstico, com maior acurácia, sensibilidade e reprodutibilidade, das principais viroses causadoras de doenças em inhame é uma ferramenta fundamental para o controle, monitoramento integrado, auxílio no melhoramento e compreensão do *status* epidemiológico. Existem vários métodos para a detecção de vírus, os mais utilizados são, o método sorológico ou teste ELISA (Clark & Adams, 1977), os de análises moleculares através dos testes de PCR, RCA, RT-PCR entre outros (Mullis et al., 1986). Contudo, todos os métodos necessitam de otimização das condições físicas e químicas, e consequente ganho de reprodutibilidade. Desse modo, esse trabalho teve como objetivo, estabelecer condições adequadas para o desenvolvimento de um protocolo para a detecção do YMV e *Badnavirus* em inhame.

Material e métodos

Material vegetal:

Em área de produtores de inhame foram selecionadas 40 plantas, com idade de seis a sete meses, sendo que, 20 plantas apresentavam sintomas característicos da infecção por viroses (clorose foliar, mosaico, clareamento das nervuras e distorção na folha) e 20 plantas sem sintomas. Dessas plantas foram coletadas túberas e folhas, usadas respectivamente para plantio em sacos de polietileno em casa-de-vegetação e para os testes de vírus.

Deteção molecular de *Badnavirus*

A extração de DNA foi realizada com base no protocolo de Kamal Sharma et al. (2008) com adaptações, coletando-se as folhas 18 horas antes do procedimento, cobrindo-as com papel alumínio e mantendo-as no escuro. Também foi aumentada a velocidade de centrifugação de 8.000 X g para 10.000 X g/10 min e a quantidade da amostra que passou de 100 mg para 200 mg de material vegetal. Após sua extração o DNA obtido foi quantificado.

Para o teste de RCA 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 2 min. 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 min (Johns et al., 2009 & James et al., 2011).

O produto do teste de RCA foi usado no teste de PCR, sendo testadas diferentes combinações de concentração de DNA e temperaturas de anelamento. Foram testadas concentrações de DNA de 12,5; 25; 50; 100; 150 e 200 ng e as seguintes temperaturas de anelamento: 57 °C; 62 °C e 65 °C.

Para cada reação do teste de PCR foi usado 2 µL do RCA em cada teste de concentração e temperatura, 2,5 µL tampão 10X da Taq, 1,2 µL MgCl₂ (50 mM), 1 µL de cada par de *primers* (10 mM) Badna FP (ATGCCITTYGGIITIAARAAYGCICC) e Badna RP (CCAYTTRCAIACISICCCCAICC) (YANG et al., 2003), 0,2 µL de *Taq Polimerase* (0,2 U) (Invitrogen), 1 µL de dNTP (10 mM) e 16,1 µL de água.

A reação foi levada ao termociclador com o seguinte programa: 94 °C por 3 min, 94 °C por 30 s, utilizando cada temperatura de anelamento descritas anteriormente por 30 s, 72 °C por 1,5 minutos, 72 °C por 10 minutos e 4 °C em 35 ciclos (Andrade et al., 2006).

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

Detecção molecular de YMV e YMMV

Para a extração de RNA das plantas de inhame foram testadas três diferentes metodologias com algumas modificações: *Kit* de extração de RNA Total *Axygen*, *Easyzol* e protocolo de extração segundo Gambino et al. (2008). Com o *Kit* de Extração de RNA Total *Axygen*, a quantidade de amostra macerada foi aumentada de 100 mg para 150 mg. No protocolo do *kit Easyzol* a centrifugação foi alterada de 12.000 X g de 5-10 min para 15.000 X g por 3 min em todas as fases. Na metodologia de Gambino et al. (2008), foi modificada a quantidade de material vegetal, utilizando-se 100 mg ao invés de 150 mg de amostra e após a incubação realizou-se uma centrifugação de 15.500 X g por 20 min ao invés de 21.000 X g por 30 min.

Na reação de RT-PCR avaliou-se o uso de diferentes concentrações de RNA: 130 ng, 70 ng e 20 ng, onde foram feitas reações diferentes com 13 µL, 7 µL e 2 µL de RNA total (10 ng µL⁻¹), mais 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, 2 min 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).

Em seguida foi realizada a reação de RT-PCR para YMV, utilizando 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) (Mumford & Seal, 1997), 0,2 µL de *Taq Polimerase* (0,2 U), 1 µL de dNTP (10 mM) e 16,1 µL de água. 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) (Mumford & Seal, 1997), 0,2 µL de *Taq Polimerase* (0,2 U), 1 µL de dNTP (10 mM) e 16,1 µL de água, utilizando metodologia do *kit* de extração de RNA Total *Axygen*.

A reação de RT-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 50 °C, 1,5 min a 72 °C, com uma extensão final de 10 min a 72 °C. Já para o YMMV usou-se as mesmas condições e

uma temperatura de anelamento de 55 °C a 30 s. 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).

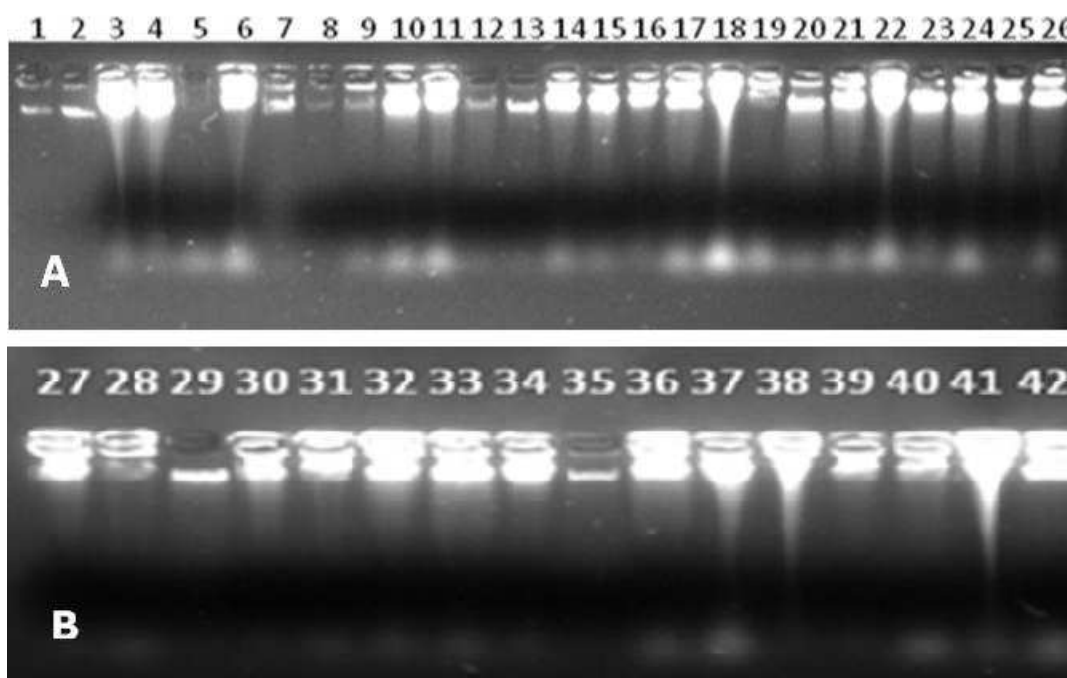
O controle positivo para o YMV foi obtido de amostra sintomática, que após a reação no teste de RT-PCR foi sequenciada pela Macrogen Inc. (Seul, Coréia do Sul) e comparada com as sequências de YMV disponíveis no *GenBank* (Edgar et al., 2004).

Resultados e discussão

Detecção de *Badnavirus*

As alterações na quantidade de amostra macerada, nas centrifugações, e a coleta das folhas 18 horas antes da extração, mantendo-as cobertas com papel alumínio e no escuro, permitiram uma redução dos metabolitos secundários, reduzindo a oxidação e favoreceram a qualidade do DNA obtido (Figura 1) (Kamal Sharma et al., 2008).

Figura 1- A e B- Quantificação do DNA total obtido das 40 amostras de inhame em gel de agarose a 1%. **1 e 2:** Marcador lambda (50 e 100 pb); **3 a 42:** Amostras de inhame coletadas no Recôncavo da Bahia.



A reação de PCR feita com o produto do teste de RCA, utilizando a temperatura de anelamento de 57 °C com concentrações de DNA de 12,5; 25; 150 e 200 ng, não produziram *amplicons* (Figuras 2, 3 e 4). Porém usando concentração de DNA de 50 e 150 ng, com a mesma temperatura de anelamento e usando-se o teste de RCA, passou-se a observar bandas

inespecíficas (Figura 3).

A utilização do teste de RCA antes da reação de PCR torna mais sensível a detecção do vírus. Contudo, sem o uso desta técnica, há a possibilidade da reação do teste de PCR convencional não detectar o vírus na cultura, já que a sua concentração nas folhas é baixa (Johne et al., 2009).

Figura 2- Padrão eletroforético em gel de agarose a 1% para detecção de *Badnavirus* com os *amplicons* obtidos na reação do teste de PCR a partir de cinco amostras de diferentes plantas de inhame. **1 e 12:** marcador (1 kb DNA *Ladder*); **2 a 6:** 12,5 ng de DNA, **7 a 11:** 25 ng de DNA, **13 a 17:** 50 ng de DNA. PCR com temperatura de anelamento de 57 °C.

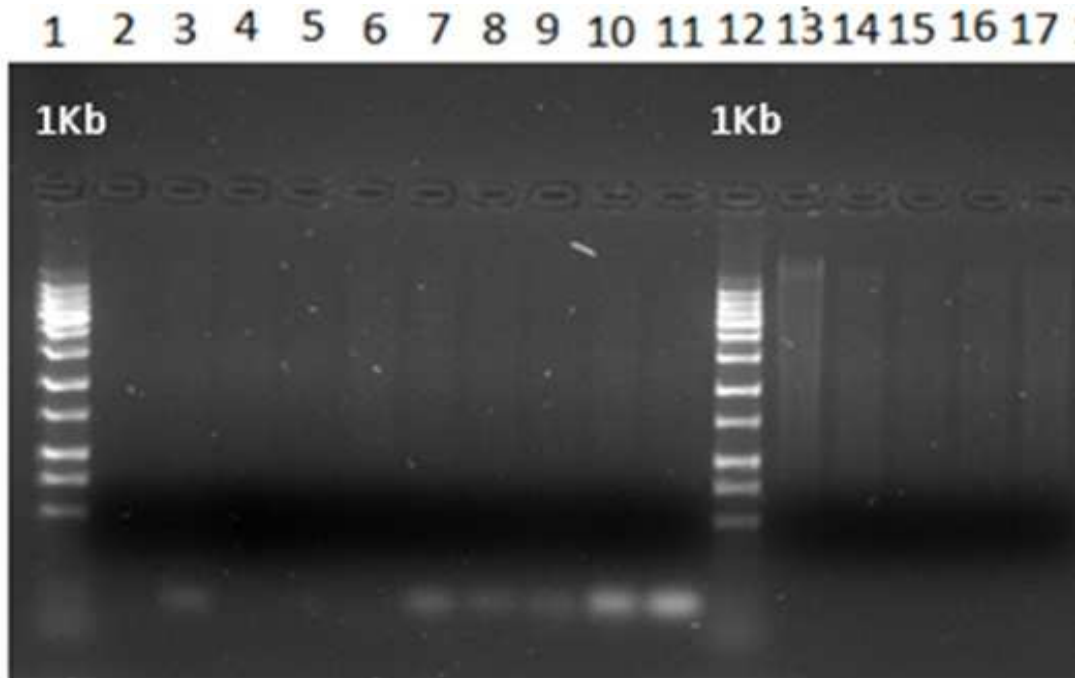


Figura 3- Padrão eletroforético em gel de agarose a 1% para *Badnavirus* com os *amplicons* obtidos na reação do teste de PCR a partir de cinco amostras de diferentes plantas de inhame submetidas à técnica do RCA. **1 e 13:** marcador (1 kb DNA *Ladder*); **2 a 6:** 50 ng de DNA. **7 a 11:** 100 ng de DNA. **14 a 18:** 150 ng de DNA. **19 a 23:** 200 ng de DNA. Utilizando a temperatura de anelamento de 57 °C.

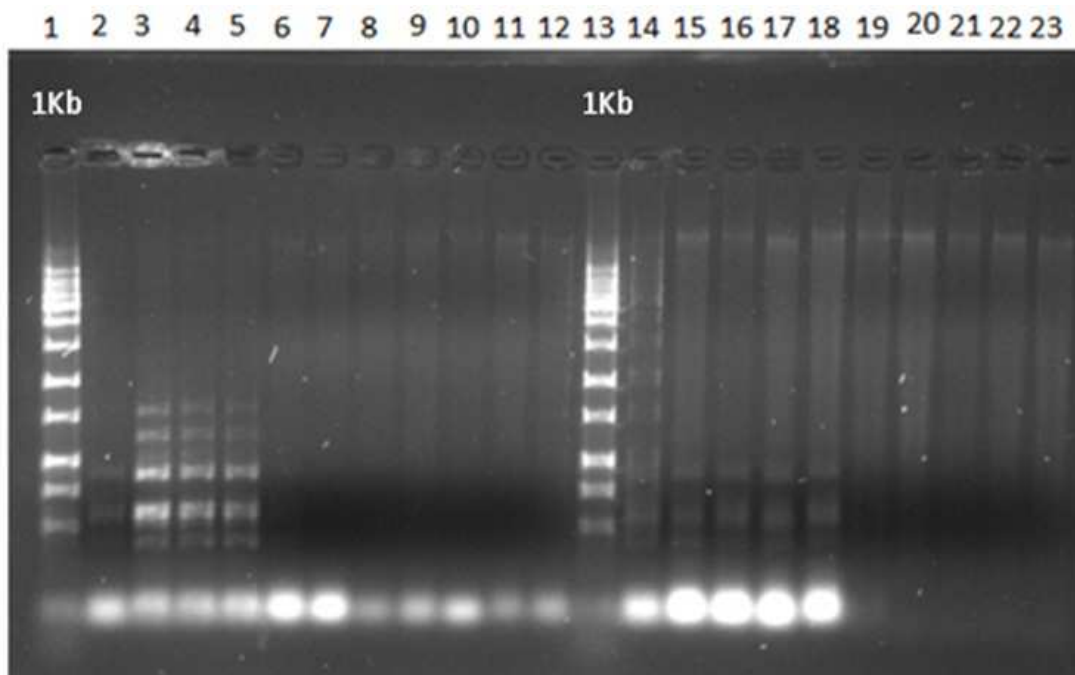
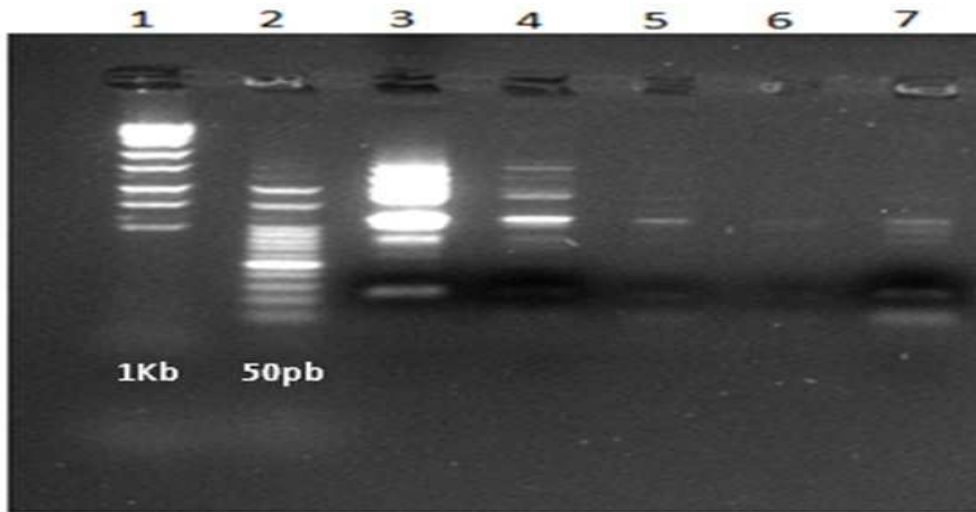


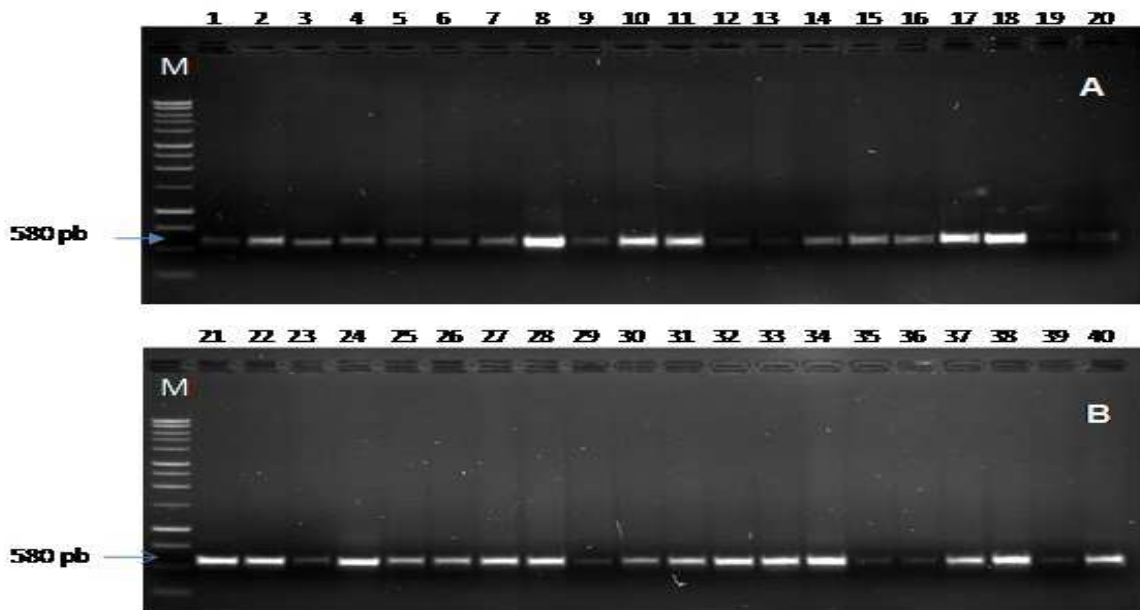
Figura 4- Padrão eletroforético em gel de agarose a 1% da reação do teste de PCR para *Badnavirus* com os *amplicons* obtidos a partir de cinco amostras de diferentes plantas de inhame. **1 e 2:** marcador (1 kb DNA *Ladder* e marcador de 50 pb); **3 a 7:** 50 ng de DNA, utilizando a temperatura de anelamento de 62 °C.



Na temperatura de anelamento de 65 °C, usando a concentração de DNA - 50 ng, a reação do teste de PCR foi específica com os *primers* utilizados por Yang (Yang et al., 2003) e obteve-

se um produto com tamanho esperado (cerca de 580 pb) nas 40 amostras analisadas e que apresentou alta homologia com *Badnavirus* (Figura 5).

Figura 5 - A e B- Padrão eletroforético em gel de agarose a 1% com os *amplicons* obtidos na reação do teste de PCR para *Badnavirus* a partir das amostras de DNA total extraídas de plantas de inhame, submetidas à técnica do RCA. **M:** marcador (1 kb DNA *Ladder*); **1 a 40:** Amostras de diferentes plantas de inhame, sendo a amostra 24 o controle positivo.



A presença de *Badnavirus* em amostras de inhame na Bahia também foi detectada por vários autores (Andrade et al., 2006, Moura et al., 2006 & Lima et al., 2013).

Considerando que esse vírus causa grande redução na produção da cultura é considerado de grande importância e fator limitante no intercâmbio nacional e internacional de material propagativo (Kenyon et al., 2008 & Bousalem et al., 2009).

Detecção de *Potyvirus*

A extração de RNA usando o *Kit* de extração de RNA Total *Axygen* e *Easyzol* não apresentou bons resultados. No entanto com a metodologia de Gambino et al. (2008) ajustada,

foi possível extrair RNA de boa qualidade de plantas de inhame (Figura 6).

Na reação do teste de RT-PCR obteve-se melhor resultado com o uso de 130 ng de cDNA para o YMV (Figura 7).

Todas as amostras coletadas no Recôncavo da Bahia estavam infectadas com o YMV, apresentando um fragmento de aproximadamente 586 pares de bases (Figura 8), conforme relatado por Mumford e Seal ao usar esses *primers* (Mumford & Seal, 1997). Andrade et al. (2006) analisando amostras de inhame provenientes dos Estados de Alagoas, Pernambuco e Paraíba obtiveram resultados semelhantes com esse par de *primers*.

O YMMV não foi detectado em nenhuma das amostras avaliadas.

Figura 6- Quantificação do RNA total obtido de seis amostras de inhame em gel de agarose a 1% pelo protocolo de Gambino (2008) com modificações. **1 e 2:** Marcador lambda (50 e 100 pb); **3 a 8:** RNA total obtido de amostras de inhame coletadas no Recôncavo da Bahia.

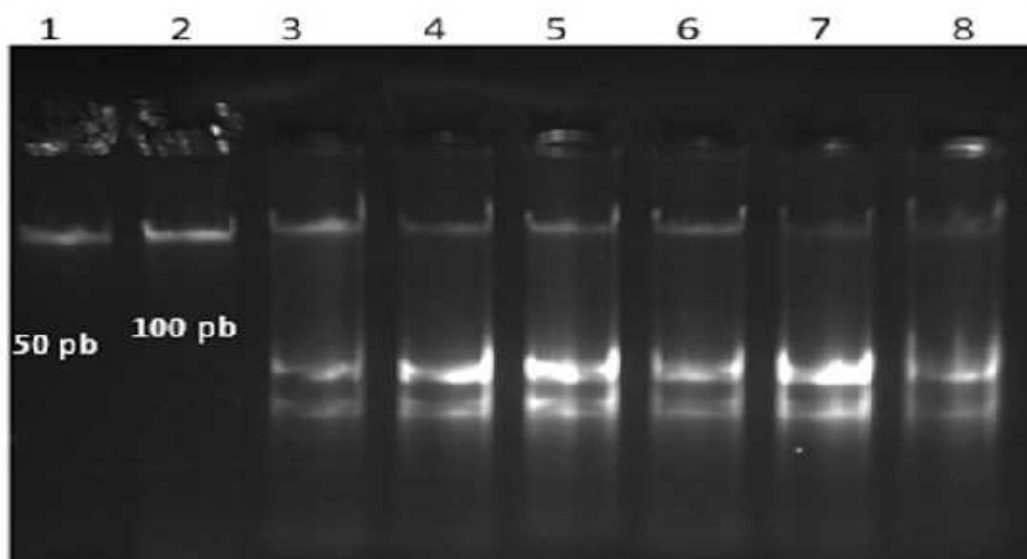


Figura 7- Padrão eletroforético em gel de agarose 1% de *amplicons* obtidos no teste de RT-PCR com *primers* para YMV e YMMV a partir de amostras de RNA total, extraídas de folhas de inhame. **1 e 20:** Marcador (1 kb DNA *Ladder*); **2 a 38:** amostras de inhame coletados no Recôncavo da Bahia. Sendo que, **2 a 7:** 130 ng, **14 a 19:** 70 ng, **27 a 32:** 20 ng de concentração de RNA na reação do teste de RT-PCR, utilizando temperatura de anelamento de 50 °C para o YMMV. Enquanto que os poços **8 a 13:** 130 ng, **21 a 26:** 70 ng, **33 a 38:** 20 ng de concentração de RNA na reação do teste de RT-PCR, utilizando temperatura de anelamento de 55 °C para o YMV.

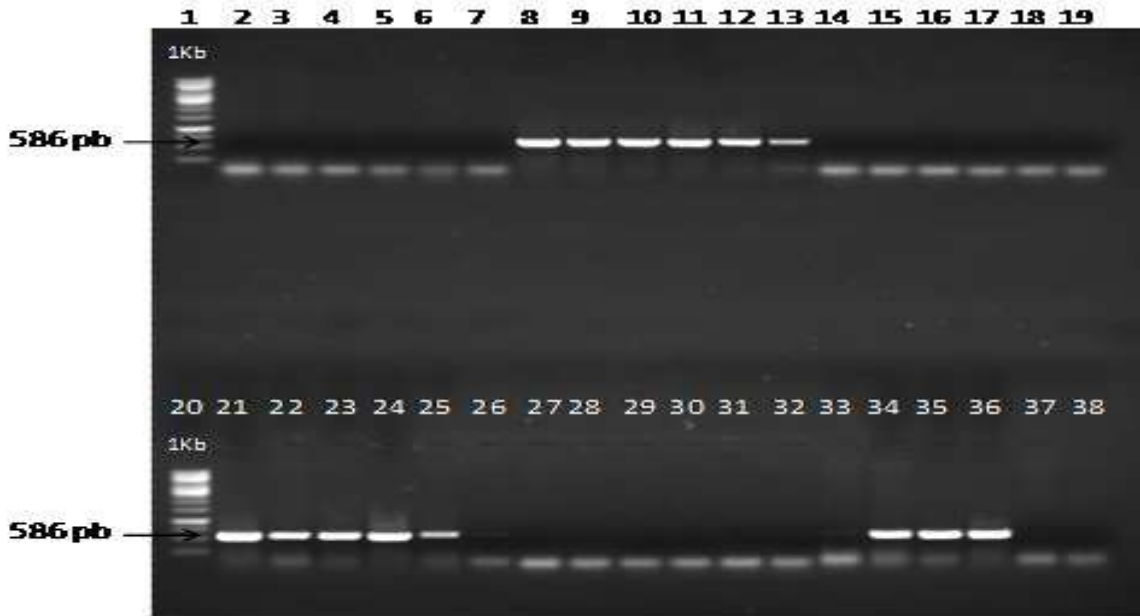
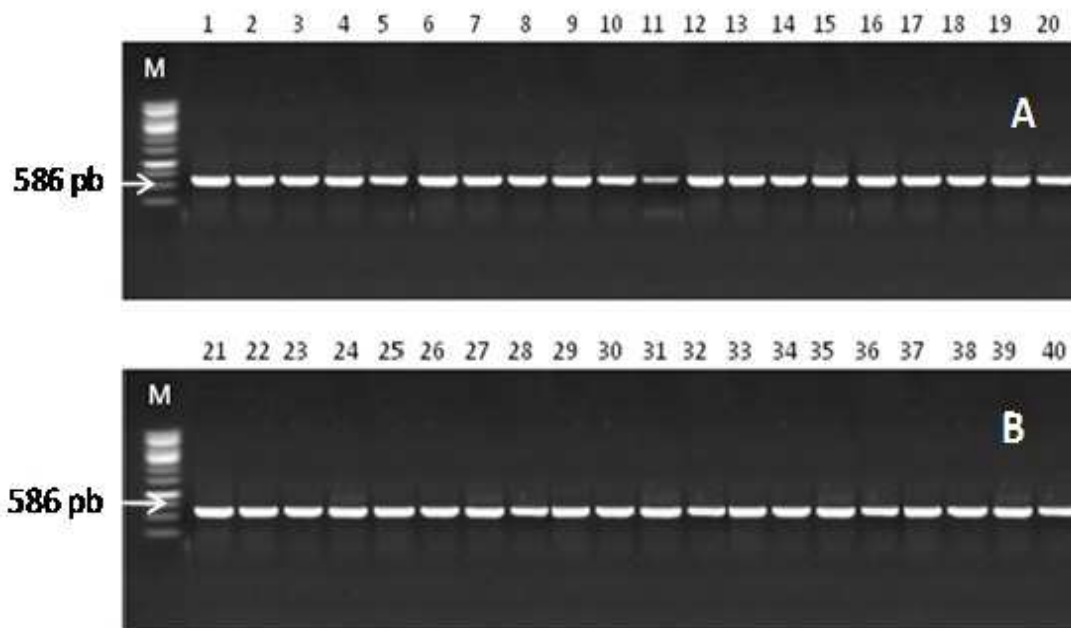


Figura 8- Padrão eletroforético em gel de agarose 1% de *amplicons* da reação do teste de RT-PCR para YMV, obtidos a partir de RNA total, extraído de folhas de inhame. **M:** Marcador (1 kb DNA *Ladder*); **1 a 40:** amostras extraídas de inhame com concentração de $10 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ de RNA. Sendo que, o teste de RT-PCR foi realizado com temperatura de anelamento de 55 °C.



Conclusões

Com os ajustes feitos nas metodologias avaliadas foi possível a detecção do *Yam mosaic virus* e de *Badnavirus* em amostras obtidas de inhame no Recôncavo da Bahia.

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

Diante dos resultados constatados, torna-se imprescindível a adoção de estratégias de manejo e controle preventivo de vírus na cultura.

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.
- Bousalem, M., Durand, O., Scarcelll, N., Lebas, B.S.M., Kenyon, L., Marchand J.L., Lefort F., & Seal, S.E. (2009). Dilemmas caused by endogenous pararetroviruses regarding the taxonomy and diagnosis of yam (*Dioscorea* spp.) badnaviruses: Analyses to support safe germplasm movement. *Archives of Virology*, 154, 297-314.
- Clark, M.F., & Adams, A.N. (1977). Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *Journal of General Virology*, [Spencers Wood], 34, 475-483.
- 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.
- Eni, A.O., Hughes, J.D'A., Asiedu, R., & Rey, M.E.C. (2008). Sequence diversity among badnavirus isolates infecting yam (*Dioscorea* spp.) in Ghana, Togo, Benin and Nigeria. *Archives of Virology*, 153, 2263-2272.
- Food and Agriculture Organization. FAOSTAT 2012. Recuperado em 25 setembro, 2013 de <http://faostat.fao.org/site/567/default.aspx#ancor>.
- 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.
- 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.
- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. (2014). Produção de inhame. *Base de dados de 2010*. Recuperado em 23 fevereiro, 2014 de <http://www.ibge.org.br>.
- 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 genome using phi29 polymerase. *Trends in Microbiology*, 17, 205-211.
- Kamal Sharma, K., Mishra, A.K., & Misra, S.A. (2008). 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*, 153, 877-889.
- King, A.M.Q., Adams, M.J. Carstens, E.B., & Lefkowitz, E.J. (2012). *Virus Taxonomy*. (9th, 1327p). Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. London UK San Diego: Elsevier Academic Press.
- 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 *badnavirus* 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. (2005). Doenças do inhame-da-costa (*Dioscorea cayennensis*). In: H. Kimati, L. Amorim, J.A.M., Resende, A. Bergamin Filho & L.F.A Camargo (Eds.). *Doenças das Plantas Cultivadas* (Manual de Fitopatologia 2, pp.415-419). São Paulo: Editora Agronômica CERES., 415-419.

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 (2), 211.

Mullis, K.F., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., & Erlich, H. (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Quantitative Biology*. Cold Spring Harbor, 51, 263-273.

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.

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.

Thouvenel, J.C., Dumont, R. (1990). Yield decreases in yam infected with mosaic virus in Cote d'Ivoire. *L'Agronomie Tropicale*, 45, 125-129.

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: 07/010/2014

Aceito em: 23/04/2016