

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS
CURSO DE MESTRADO**

**DETECÇÃO MOLECULAR DE ESPÉCIES DE *YAM MOSAIC VIRUS*
E *BADNAVIRUS* QUE INFECTAM INHAME (*Dioscorea rotundata*)
CULTIVADO NO RECÔNCAVO DA BAHIA.**

DANILO PEREIRA COSTA

**CRUZ DAS ALMAS – BAHIA
FEVEREIRO – 2014**

**DETECÇÃO MOLECULAR DE ESPÉCIES DE *YAM MOSAIC VIRUS*
E *BADNAVIRUS* QUE INFECTAM INHAME (*Dioscorea rotundata*)
CULTIVADO NO RECÔNCAVO DA BAHIA.**

DANILO PEREIRA COSTA

Engenheiro Agrônomo

Universidade Federal do Recôncavo da Bahia – 2011

Dissertação submetida ao Colegiado de Curso do Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre em Ciências Agrárias, Área de Concentração: Fitotecnia.

Orientador: Dr. Sebastião de Oliveira e Silva

Co-Orientador: Dr. Paulo Ernesto Meissner Filho

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA

MESTRADO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS

CRUZ DAS ALMAS - BAHIA – 2014

FICHA CATALOGRÁFICA

Costa, Danilo Pereira.

Detecção molecular de espécies de *Yam mosaic virus* e *Badnavirus* que infectam inhame (*Dioscorea rotundata*) cultivado no Recôncavo da Bahia / Danilo Pereira Costa.– Cruz das Almas, 2014.

75 f. il.; 30 cm.

Orientador: Dr. Sebastião de Oliveira e Silva.

Co-Orientador: Dr. Paulo Ernesto Meissner Filho
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal da Bahia do Recôncavo da Bahia. Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas, 2014.

1. Inhame. 2. Doença de planta. I. Silva, Sebastião de Oliveira e. II. Meissner Filho, Paulo Ernesto. III. Universidade Federal da Bahia do Recôncavo da Bahia. IV. Título.

CDD: 635.23 – 21. ed.

CDU: 633.4

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS

COMISSÃO EXAMINADORA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DO
ALUNO DANILO PEREIRA COSTA

Dr. Sebastião de Oliveira e Silva

Dr. Saulo Alves Santos de Oliveira

Dr^a. Cristiane de Jesus Barbosa

Dissertação homologada pelo Colegiado do Curso de Mestrado em Ciências Agrárias em.....

Conferindo o Grau de Mestre em Ciências Agrárias em.....

DEDICATÓRIA

A Deus;

À minha família;

Em especial as Antônias que fizeram e fazem parte da minha vida. À minha vó Antônia (*in memoriam*) que foi meu porto seguro na minha infância, passando seus ensinamentos do dia a dia no campo, fato esse que favoreceu a me tornar o que sou hoje, ENGENHEIRO AGRÔNOMO. À minha mãe Antônia, que por algumas vezes, sentindo-me desacreditado e perdido nos meus objetivos e ideais, sempre me incentivou a nunca desistir, por maior que fosse o obstáculo, ensinando a levantar e dar a volta por cima, pois a vitória pode até demorar, mais um dia ela virá. Dedico ainda, a todos que torceram por mim e me acompanharam sempre.

Dedico

Ao meu Pai Heraldo Pereira Costa;

À minha companheira, amiga e namorada Jeskarlandia Barros;

Aos meus amigos, por compartilhar cada momento.

Ofereço

"Quem caminha sozinho pode até chegar mais rápido, mas aquele que vai acompanhado, com certeza vai mais longe."

(Clarice Lispector)

AGRADECIMENTOS

A Deus por me dar força de vontade para vencer todos os obstáculos e permitir concluir mais essa etapa da minha história de vida;

A toda minha família, em especial, Antônia e Heraldo, que me educaram e me conduziram da melhor maneira, meus irmãos pelo apoio irrestrito e meus amigos da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia - UFRB;

À Jeskar, minha companheira, que se mostrou paciente e afetuosa durante este período;

À Universidade Federal do Recôncavo da Bahia – UFRB, e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias, por terem me dado à oportunidade de avançar meus conhecimentos.

À Embrapa Mandioca e Fruticultura pela estrutura disponibilizada para a execução desse trabalho;

Aos novos colegas e amigos feitos no laboratório de virologia da Embrapa Mandioca e Fruticultura (Adriana, Daniela, João, Keylla, Antônio Márcio, Andréa, Tailan, Taylane e Camila), por me aturarem todos os dias durante esse trabalho e que deram grande apoio em vários momentos complicados, além de terem tirado muitas dúvidas até que eu pudesse dar o primeiro passo sozinho.

Ao orientador Sebastião de Oliveira e Silva por sua amizade, atenção e convívio prestado durante dois anos de orientação;

Ao meu co-orientador e amigo, Dr. Paulo Ernesto Meissner Filho por seus ensinamentos. Em especial a Emanuel Felipe Medeiros Abreu, analista do Laboratório de Virologia da Embrapa, que com empenho e dedicação alavancou idéias pertinentes no campo da pesquisa em virologia para realização deste trabalho. Lembrando sempre, que quando os trabalhos davam certos, ele dizia: “Massa”, marca registrada dele no laboratório;

À equipe do Laboratório de Biologia Molecular (LBM) da Embrapa Mandioca e Fruticultura, em especial Raimundo Pereira e Vandeson Rodrigues, pela amizade, auxílio, aprendizado e pela capacidade de não medirem esforços para estarem sempre prontos a colaborar;

Ao amigo Bizunga, da equipe de trabalho de campo da Embrapa Mandioca e Fruticultura;

Ao corpo de professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias, pela atenção e apoio.

À Capes pelo apoio financeiro concedido (bolsa de estudo);

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para o desenvolvimento deste trabalho de mestrado.

Ao Banco do Nordeste do Brasil (BNB) pelo financiamento do projeto com iname.

SUMÁRIO

SUMÁRIO	IX
RESUMO	X
ABSTRACT	XI
CAPÍTULO I – A CULTURA DO INHAME E SUAS VIROSES	12
1. INTRODUÇÃO	13
1.1. ASPECTOS GERAIS	13
1.2. IMPORTANCIA ECONÔMICA DO INHAME	14
1.3. VIROSES DA CULTURA DO INHAME	15
1.3.1. FAMÍLIA <i>POTYVIRIDAE</i>	16
1.3.2. FAMÍLIA <i>CAULIMOVIRIDAE</i>	17
1.4. DETECÇÃO DE VIROSES	20
1.5. CONTROLE DE VIROSES	21
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	25
CAPÍTULO II – DETECÇÃO MOLECULAR DE <i>POTYVIRUS</i> E <i>BADNAVIRUS</i> EM INHAME (<i>Dioscorea rotundata</i>) CULTIVADO NO RECÔNCAVO DA BAHIA	32
RESUMO	33
ABSTRACT	34
INTRODUÇÃO	34
MATERIAL E MÉTODOS	36
RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
CONCLUSÕES GERAIS	50
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	50
ANEXO I	59
ANEXO II	73

RESUMO

O inhame (*Dioscorea* spp.) é uma espécie rica em vitaminas A e B, ácido ascórbico e carboidratos. Esta cultura tem grande importância social e econômica para a região Nordeste do Brasil, destacando-se na sua produção os estados da Paraíba, Pernambuco, Alagoas, Bahia e Maranhão. No Recôncavo Da Bahia os principais produtores são os municípios de Maragojipe, São Felipe, Cruz das Almas e São Félix. As doenças são um dos principais problemas da cultura do inhame, sendo que as viroses ocupam lugar de destaque. Este trabalho teve como objetivo a detecção molecular de espécies de *Yam mosaic virus* e *Badnavirus* que infectam inhame (*Dioscorea rotundata*) cultivado no Recôncavo Da Bahia. Túberas de inhame foram coletadas em plantios conduzidos no Recôncavo Da Bahia. Depois da brotação as túberas foram plantadas em sacos plásticos em casa de vegetação na Embrapa Mandioca e Fruticultura. Para a detecção de Badnavírus, o DNA total foi extraído seguindo a metodologia de Kamal Sharma (2009) com adaptações na concentração, centrifugação e temperatura de anelamento. Em seguida foi feito a RCA (*Rolling Circle Amplification*) para aumentar a quantidade de DNA circular do vírus, depois foi realizada a PCR (*Polymerase Chain Reaction*) usando primers específicos para *Badnavirus*, obtendo-se uma banda de 579 pares de bases (pb). Para a extração de RNA do vírus do mosaico do inhame (*Yam mosaic virus*, YMV) e para o vírus do mosaico suave do inhame (*Yam mild mosaic virus*, YMMV) foram testadas três metodologias: Kit Axygen, Easyzol e Gambino (2008) com modificações e em seguida realizou-se a RT-PCR com primers específicos para esses vírus. Dentre as metodologias testadas, a de Gambino (2008) com adaptações apresentou RNA de melhor qualidade e permitiu na RT-PCR amplificar um fragmento de 586 pb para o YMV. Para o YMMV não houve amplificação nas amostras analisadas. Os fragmentos genômicos obtidos foram sequenciados e comparados com sequências disponíveis em bancos de dados do GenBank e, apresentaram alta identidade com espécies do gênero *Badnavirus* com similaridade 92% com o isolado DBV_GH03_Dr (AM072664.1) e com o YMV, apresentando 97% de identidade com o isolado *Yam mosaic virus* capa proteica DrGha4. Desta forma foi comprovada a presença de uma espécie de *Badnavirus* e do YMV em inhame cultivado no Recôncavo Da Bahia.

Palavras Chave: YMV, extração, PCR, RT-PCR.

ABSTRACT

Yam (*Dioscorea* spp.) is a tuberous crop rich in vitamins A, B and C (ascorbic acid) and carbohydrates. It has great social and economic importance to North Eastern region of Brazil, concentrating its production in the states of Paraíba, Pernambuco, Alagoas, Bahia and Maranhão. In the Recôncavo of Bahia, the municipalities of Maragogipe, São Felipe, Cruz das Almas and São Felix are major producers. Diseases can become a threat to yam production, and the ones caused by viruses are most frequent. This work had the objective of molecular detection of *Yam mosaic virus* and *Badnavirus* species that infect yam (*Dioscorea rotundata*) in Bahia. Yam tubers were collected in cropping areas, left to sprout, planted in plastic bags and grown in green house, at Embrapa Cassava and Fruit Crops. Detection of *Badnavirus* used total DNA, extracted, adapting the method by Kamal Sharma (2009), based on centrifuging and yellow ringing. Then, Rolling Circle Amplification (RCA) was used to increase the quantity of viral circular DNA, followed by Polymerase Chain Reaction (PCR) using specific primers to *Badnavirus*. A band of 579 base pairs (bp) was obtained. In the extraction of RNA from *yam mosaic virus*, (YMV) and *yam mild mosaic virus* (YMMV) three methodologies were tested: Kit Axygen, Easyzol and Gambino (2008) with modifications. In all cases, RT-PCR with specific primers for these viruses was conducted. Modified Gambino (2008) yielded higher quality RNA, allowing a 586bp amplified fragment for YMV, while for YMMV there was no amplification in the samples. The obtained genomic fragments were sequenced and compared with respective sequences from a GenBank database, showing high identity with species of *Badnavirus* (92% similarity with isolate DBV_GH03_Dr (AM072664.1) and YMV (97% similarity with protein cap isolate DrGha4). Therefore, the presence of one species of *Badnavirus* and YMV was found in yam crop of the Recôncavo in Bahia.

Key-words: YMV, extraction, PCR, RT-PCR.

CAPÍTULO I

A CULTURA DO INHAME E SUAS VIROSES

1. INTRODUÇÃO GERAL

1.1. Aspectos gerais: botânica, classificação e origem.

O inhame é uma angiosperma monocotiledônea pertencente à ordem *Dioscoreales*, família *Dioscoreaceae*, gênero *Dioscorea*, que além de ser uma tuberosa rica em vitaminas do complexo B (contendo altos teores de tiamina, riboflavina, niacina), vitamina A, ácido ascórbico, carboidratos e grãos de amido, constituem-se um alimento básico para a população e pode ainda ser utilizado na agroindústria farmacêutica (Moura, 2005). As espécies são consideradas plantas do tipo herbáceas perenes, cultivadas para o consumo de seus tubérculos na África, América Latina, Ásia e Oceania (Santos; Macêdo, 2006). O inhame cultivado no Brasil tem por centro de origem o continente africano e asiático (SANTOS et al., 2006).

O gênero é composto de plantas trepadeiras anuais ou perenes cuja porção subterrânea produz túberas, sendo que, possui mais de 150 espécies e cerca de 600 cultivares usadas para fins agrícolas. As mais importantes de interesse comercial, aquelas que produzem túberas comestíveis são: *Dioscorea cayennensis*, *D. rotundata*, *D. alata*, *D. trifida* e *D. esculenta* (SILVA et al., 2012). O inhame é uma planta que apresenta multi-ápices, sistema reprodutivo propagação vegetativa, exclusivamente por meio de túberas sementes ou pedaços de túberas (SILVA et al., 2012).

As plantas possuem inflorescência na forma de espigas axilares, geralmente solitárias raramente ocorrendo aos pares, com flores trímeras verdes de 4 mm a 6 mm de diâmetro. As flores masculinas possuem perigônio com seis peças em dois verticilos, apresentando seis estames com anteras férteis, distribuídas em um só verticilo. Os frutos são do tipo cápsulas tripartidas, bagas ou drupas. As sementes podem ser aladas, ou não, reticuladas ou lisas, com tamanhos variados possuindo embrião pequeno bem diferenciado e cotilédone lateral imerso no endosperma, o qual contém lipídeos e aleurona (JONES; MCGAVIN, 2002).

1.2. Importância econômica do inhame

A África Ocidental é a zona dominante de produção do inhame, onde cerca de 51,7 milhões de toneladas (96% da produção mundial) são produzidas em quatro milhões de hectares anualmente, principalmente, em Benin, Costa do Marfim, Gana, Nigéria e Togo (ASIEDU, 2010). O Brasil é o maior produtor dessa cultura na América do Sul, com uma área colhida de 27 mil hectares e produção de 250 mil toneladas (FAO, 2011). De acordo com o censo agropecuário brasileiro, a região Nordeste foi responsável pela produção de 164.000 toneladas de inhame, tendo os Estados da Paraíba, Pernambuco, Bahia, Alagoas, Maranhão, Sergipe, Rio Grande do Norte, Piauí e Ceará, contribuído respectivamente com 76.180, 49.500, 13.259, 13.123, 8.861, 2.203, 655, 146 e 77 toneladas (IBGE, 2010).

No Brasil, as espécies de inhame de maior aceitação no mercado são a *Dioscorea Alata* e *Dioscorea rotundata*, pela sua grande importância socioeconômica, principalmente para a região Nordeste do Brasil, sobretudo para os Estados da Paraíba, Pernambuco, Alagoas, Bahia e Maranhão e por ser uma cultura promissora, com geração de emprego e renda. O inhame é uma cultura que fortalece a agricultura familiar e auxilia na permanência da família no campo (SANTOS, 2006). No Estado da Bahia destacam-se como os maiores produtores, os municípios de Maragogipe, São Felipe, Cruz das Almas e São Félix, (SILVA et al., 2012).

No entanto, a expansão da cultura tem sido lenta e o estímulo para produzir está diminuindo entre produtores, devido ao alto custo de implantação da cultura pela necessidade do uso de tutores, à aplicação de grandes volumes de matéria orgânica no plantio e à quantidade de mão-de-obra exigida para colheita e limpeza das túberas. Também há dificuldade na aquisição de túberas semente saudáveis e com bom índice de brotação. Essa situação contrasta com o fato do inhame ser um produto com alta demanda e preço estável no mercado interno e externo (ODU et al., 2006).

Apesar da importância da cultura para o agronegócio nordestino, a produtividade do inhame é considerada baixa, principalmente em decorrência das condições inadequadas de manejo da cultura, baixa fertilidade do solo,

presença de pragas e doenças nas túberas, afetando sua qualidade. OLIVEIRA et al., 2006, afirmam que se houver o controle de pragas e doenças, a produção pode aumentar em cerca de 30%.

1.3. Viroses da cultura do inhame

Dentre os problemas enfrentados pelos produtores de inhame, tanto no Brasil quanto nos demais países produtores, estão as elevadas perdas devido às diversas doenças que ocorrem no campo, que reduzem a produção e a qualidade do produto em pós-colheita, agravadas por condições de armazenamento e transporte inadequadas (RITZINGER et al., 2003).

As viroses são de particular importância para a cultura, porque o inhame é propagado vegetativamente por meio de pequenas túberas ou pedaços de túberas, o que pode resultar no acúmulo e perpetuação de vírus e outras doenças na semente (KENYON et al. 2001, SEAL; MULLER, 2007).

Os primeiros relatos de viroses em inhame foram feitos na Nigéria na década de 30, foram encontradas plantas apresentando sintomas de mosaico que variava de moderado a severo (COOK, 1978). Em 1936, esse autor descreveu a presença de *Potyvirus* em Serra Leoa e em Porto Rico. Além desse gênero ocorrem também no inhame vírus dos gêneros *Badnavirus*, *Potexvirus*, *Maculavirus*, *Comovirus* e *Cucumovirus* (LEBOT, 2009). Em nível mundial, as viroses causadas pelas espécies do gênero *Potyvirus* têm acarretado importantes perdas econômicas na cultura do inhame (ANDRADE et al., 2006).

Apesar de existirem registros de vírus na cultura há bastante tempo em outras partes do mundo, no Brasil, poucas informações encontram-se disponíveis sobre as espécies que ocorrem em cultivos comerciais. O primeiro trabalho dessa natureza foi feito por Ávila et al. (1982), os quais detectaram a presença de um *Potyvirus* em germoplasma de inhame da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia. Pela sua importância e distribuição no Brasil tem se destacado em inhame os *Potyvirus* e *Badnavirus*, que ocorrem em infecções simples e mistas (YANG et al., 2003; ODU et al., 2006).

1.3.1. Família *Potyviridae*

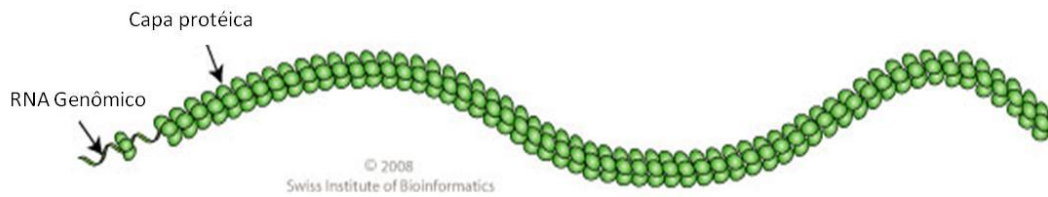
Os vírus de inhame mais completamente caracterizados são os *Potyvirus*, também relatados como sendo os mais amplamente distribuídos (KENYON et al., 2008).

A família *Potyviridae* contém os gêneros *Potyvirus*, *Brambyvirus*, *Poacevirus*, *Bymovirus*, *Rymovirus*, *Macluravirus*, *Ipomovirus* e *Tritimovirus* (KING, et al., 2012). A transmissão desses vírus ocorre geralmente por afídeos de uma forma não-persistente, apesar de alguns vírus serem transmitidos também por ácaros ou moscas brancas (ODU et al., 2006).

A família pode ser dividida em subgrupos de acordo com o tipo de corpos de inclusão que induzem e do tipo de vetor específico. Um estudo sobre variabilidade genética de isolados de *Yam mosaic virus* (YMV) mostrou a presença de uma mutação levando à perda de sua transmissibilidade, este achado sugere fortemente que este isolado pode espalhar-se apenas por propagação vegetativa (BOUSALEM et al., 2000).

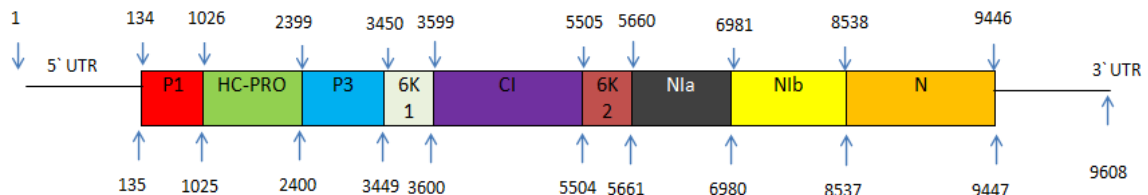
Os sintomas causados pelas viroses em inhame variam dependendo do agente envolvido, mas em geral incluem: clorose foliar, mosaico, nanismo, distorção foliar, afetando a capacidade fotossintética da planta infectada com efeitos deletérios sobre a produção, qualidade da tubera e em algumas situações causam a morte da planta (ODU et al., 2006).

As partículas virais de *Potyvirus* são não-envelopadas, flexuosas e de forma cilíndrica, relatado com 680-900 nm de comprimento e 11-15 nm de largura. O genoma é de uma única fita de RNA (+ ss) sentido positivo de cerca de 10.000 nucleotídeos e tem uma única ORF (Figuras 1 e 2). A extremidade 3' contém uma região poliadenilada (poli A) de comprimento variável. O RNA genômico codifica uma única poliproteína. Esta, em seguida, é submetida a um coprocessamento proteolítico e pós-translacional por três proteínas virais codificadas de produtos gênicos individuais, para se obter dez produtos protéicos (SILVA et al., 2012).



Fonte: Viralzone, 2014.

Figura 1: Esquema da estrutura da partícula do vírus da família *Potyviridae*. Ilustração representando a organização da partícula alongada e flexuosa comum nas diferentes espécies da família *Potyviridae*.



Fonte: Viralzone, 2014.

Figura 2: Estrutura do genoma de *Potyvirus* (Detalhe no anexo I).

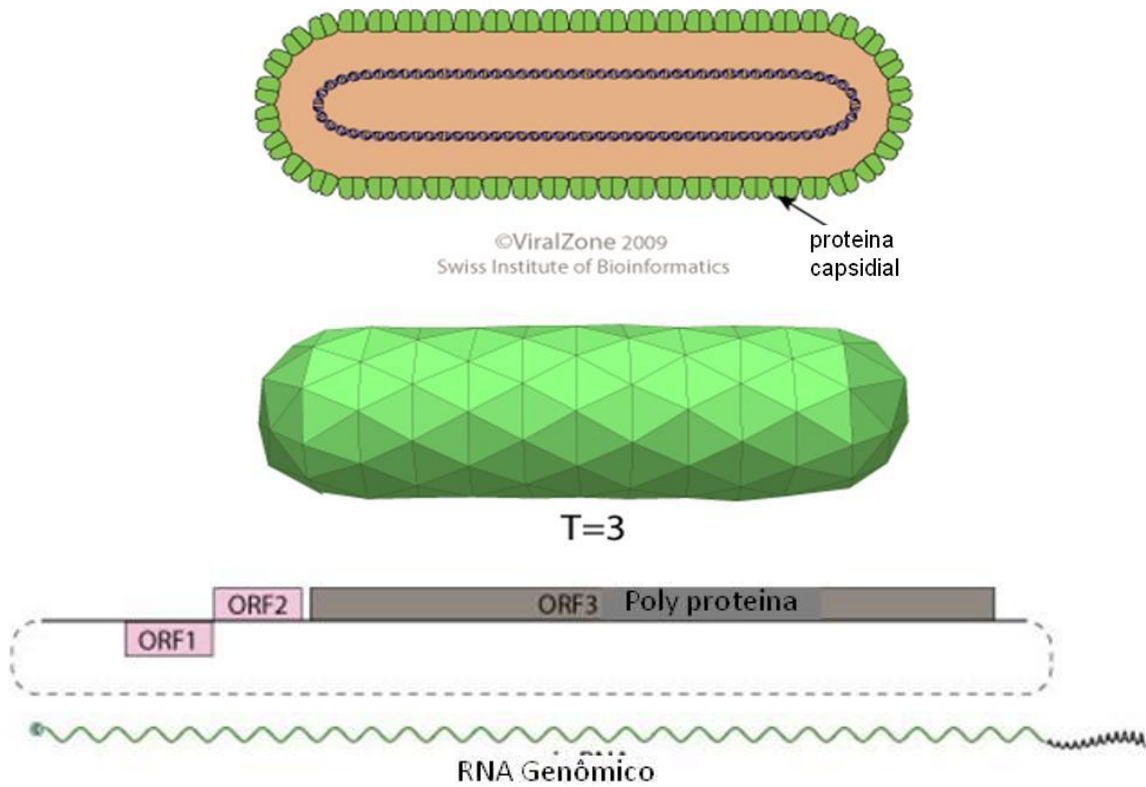
1.3.2. Família *Caulimoviridae*

De acordo com o Comitê Internacional de Taxonomia Viral (ICTV) (KING et al., 2013), a família *Caulimoviridae* pode ser taxonomicamente dividida em seis gêneros: *Caulimovirus*, *Solendovirus*, *Soymovirus*, *Cavemovirus*, *Tungrovirus*, *Badnavirus* e *Petuvirus*. A replicação dos caulimovírus, em geral, envolve duas fases: transcrição de RNA a partir do DNA viral no núcleo e transcrição reversa deste RNA para gerar dsDNA no citoplasma. O genoma desses vírus também contém uma sequência complementar ao tRNA da planta que corresponde ao sítio de iniciação da replicação do DNA. Geralmente, este

sítio está localizado dentro ou adjacente à região intergênica (região não codificante) e é geralmente designada como nucleotídeo 1 (DE KOCHKO et al., 1998).

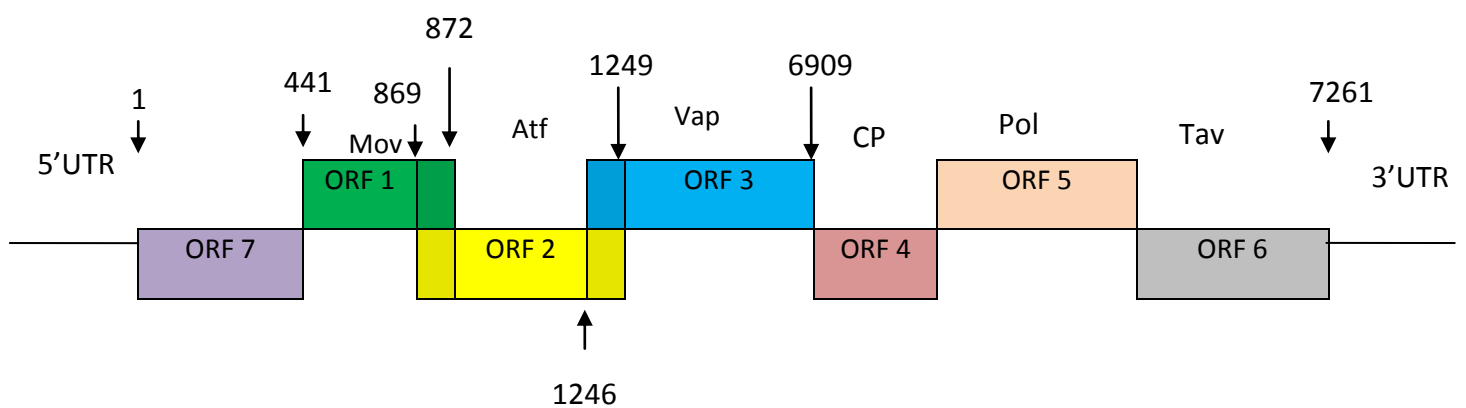
Os sintomas característicos na planta associados aos *Caulimovirus* compreendem: clareamento de nervuras, estrias, mosaico, manchas necróticas, linhas e manchas cloróticas, nanismo, enrolamento da folha, má formação foliar e enrolamento de folíolos (KING, et al., 2012). O mais numeroso gênero da família *Caulimoviridae* é o *Badnavirus*, cujos membros se apresentam como vírions baciliformes com 95-130 nm de comprimento e 24-35 nm de largura (FAUQUET et al., 2005). O genoma de *Badnavirus* (Figura 3 e 4) geralmente contém uma molécula de DNA de cerca de 7200-7600 pb que forma um círculo aberto interrompido por descontinuidades sítio-específicas e que podem conter uma região intergênica poli A (MEDBERRY et al., 1990).

A sintomatologia não é suficiente para identificar e diferenciá-los, em decorrência da variação de sintomas atribuída principalmente à época de infecção da planta de inhame (idade), da cultivar considerada, de fatores ambientais e da ocorrência de infecções mistas (INOUE-NAGATA et al., 2004). As técnicas moleculares têm permitido o desenvolvimento de métodos de detecção universal e/ou específicos de forma eficiente, rápida, acurada e de forma otimizada para cada espécie de vírus. Sendo assim, os *Badnavirus* que infectam inhame são classificados em duas espécies: *Dioscorea bacilliform AL virus* (DBALV) e *Dioscorea bacilliform SN virus* (DBSNV) (GEERING; Hull, 2012).



Fonte: Adaptado do Viralzone, 2014.

Figura 3: Estrutura da partícula do *Badnavirus*. Ilustração representando o genoma da família Caulimoviridae.



Fonte: Viralzone, 2014.

Figura 4: Ilustração do genoma do *Badnavirus* (Detalhe no anexo I).

1.4. Detecção de viroses

Com os avanços da biologia molecular, várias técnicas foram desenvolvidas como ferramenta auxiliar para identificação de fitopatógenos como é caso dos vírus, o que elevou consideravelmente a eficiência e segurança principalmente no que diz respeito à taxonomia e classificação (ZERBINI; CARVALHO; ZAMBOLIM, 2002).

Os testes mais comumente empregados para a diagnose das fitoviroses podem ser divididos em três grupos: a) biológicos baseados nas propriedades biológicas dos vírus, como morfologia da partícula e gama de hospedeiros; b) sorológicos com base na detecção da proteína capsial do vírus; c) testes moleculares, que são fundamentados na detecção e/ou análise do ácido nucléico viral. Os testes biológicos podem auxiliar em diagnose de rotina, porém, normalmente se usa um conjunto de métodos quando se deseja uma informação mais precisa (ZERBINI; CARVALHO; ZAMBOLIM, 2002).

Por meio dos estudos moleculares é possível identificar indivíduos e suas diferenças que muitas vezes são causadas por alterações de um único par de bases nitrogenadas, os quais têm aplicações imediatas na identificação e caracterização de um vírus (SOUTO et al., 2000).

A detecção de viroses de inhame tem se baseado principalmente em métodos de imunodetecção e por reação em cadeia da polimerase (PCR), ou na combinação destes métodos (PHILLIPS et al., 1999; YANG et al., 2003; KENYON et al., 2008). A técnica de PCR tem sido utilizada para o diagnóstico de *Badnavirus* em várias culturas, no entanto, estes testes têm várias limitações, incluindo a incapacidade do anti-soro em detectar todos os isolados virais; a falta de primers específicos para detectar estirpes desses vírus (GEERING et al., 2000; HARPER et al., 2005;), e a ocorrência de falsos positivos devido à presença de cópias de sequências integradas (GEERING et al., 2000).

Inoue-Nagata et al. (2004) desenvolveram um método simples de clonagem que se fundamenta na amplificação por círculo rolante pela polimerase do bacteriófago Phi29, o RCA (*Rolling Circle Amplification*), em seguida a PCR e depois leitura em gel agarose (eletroforese). A utilização

desta técnica tem permitido estudos sobre a diversidade genética e epidemiologia de vírus com genoma de DNA circular numa variedade de culturas como tomate, soja, batata-doce, algodão e banana (CASTILLO-URQUIZA et al., 2008; FERNANDES et al., 2008; PAPROTKA et al., 2010; KUMAR et al., 2010; JAMES et al., 2011).

Com o aprimoramento e adaptação do RCA para outras espécies de vírus de genoma circular, a confirmação do *status* taxonômico de espécies do gênero *Badnavirus* será mais precisa, já que possui a capacidade de amplificar seletivamente o DNA circular. Devido à falta de testes robustos de diagnose com a capacidade de detectar a vasta gama de variabilidade genômica e sorológica que se conhece dentro de espécies do gênero *Badnavirus*, tanto a diagnose para controle de viroses, quanto à taxonomia ficam comprometidas (JAMES et al., 2011).

Apesar de existirem registros de viroses na cultura do inhame há bastante tempo em outras partes do mundo, no Brasil, poucas informações encontram-se disponíveis sobre as espécies que ocorrem em cultivos comerciais.

No Brasil um dos primeiros relatos de vírus em inhame foi feito por Ávila et al., (1982), que encontrou um *Potyvirus* numa Coleção de Inhame na Bahia, que não foi caracterizado por apresentar dificuldades na transmissão mecânica e por insetos. Nessas amostras foram observadas em microscopia eletrônica, partículas e inclusões típicas de potyvirus. Recentemente foram feitos os relatos dos *Potyvirus* (YMV e YMMV) e de um *Badnavirus* em inhame na região Nordeste (ANDRADE et al., 2006).

1.5. Controle de viroses

Ao contrário de doenças causadas por fungos, bactérias e nematóides, não há maneira economicamente viável de eliminar os vírus de uma planta infetada. Assim, no geral, as medidas de controle de viroses são essencialmente preventivas, impedindo ou dificultando a chegada dos vírus a uma dada cultura e sua dispersão e/ou tornar a planta resistente ao vírus.

A identificação da praga e a diagnose segura da doença em qualquer cultura são de fundamental importância para se determinar as medidas necessárias para se atingir o seu controle eficaz. Atualmente, as técnicas de diagnose, usando-se métodos moleculares têm sido bastante indicadas, especialmente para as viroses, por proporcionar resultados precisos na sua detecção e permitir o controle para minimizar perda de produção por este distúrbio (GEERING; HULL, 2012).

A disseminação de um vírus (*Potyvirus* e *Badnavirus*) pode ser potencializada quando se considera que o inhame é, comercialmente, multiplicado por subdivisão nas túberas, já que o vírus é sistêmico ele pode ser transmitido pelas túberas. Outros fatores que contribuem para o agravamento do problema são: presença de infecção mista ou diferentes espécies de vírus infectando uma mesma planta. As viroses são difíceis de serem controladas, além de serem bastante destrutivas. A infecção de uma planta por um vírus, geralmente, resulta no declínio de plantas e, conseqüentemente, na redução da longevidade do plantio de inhame, diminuição da produção da qualidade das túberas. Entretanto, devido à natureza dessas doenças, o estado fitossanitário do material propagativo a ser utilizado no plantio é o fator de grande importância para o seu controle (SANTOS, 2006).

Diversos métodos têm sido desenvolvidos para a detecção e identificação de vírus de plantas. A diagnose de viroses em inhame é baseada, principalmente, em resultados obtidos nos testes de campo e nos testes laboratoriais. Isso ocorre porque a sintomatologia apresentada por plantas doentes no campo pode ser complexa, envolver diversos agentes virais e não ser característica de uma doença em particular. A diagnose acurada, com a correta identificação do agente causal da doença, assim como a sua distribuição no campo, é essencial para o estabelecimento de medidas eficientes ao seu controle. Por isso, métodos biológicos, sorológicos e moleculares têm sido utilizados na detecção e identificação de vírus em inhame (LEBOT, 2009).

A aquisição e o plantio de túberas, livres de vírus, são de fundamental importância no estabelecimento de novas áreas, pois, esta medida diminui o risco da introdução desses patógenos no plantio de inhame e, assim, reduz a

sua disseminação via material propagativo infectado. A qualidade sanitária do material propagativo a ser utilizado no plantio é primordial para não se ter problemas com viroses na cultura.

No momento, as medidas preventivas são as mais indicadas para o controle do *Badnavirus* e *Potyvirus*, sendo as mais relevantes: a) localização do viveiro para formação de mudas em áreas livres do vírus, estrategicamente isoladas, distante de plantações antigas; b) indexação sorológica; c) erradicação de plantas de inhamo com sintomas de viroses e d) desinfestação das ferramentas agrícolas, especialmente facas e tesouras de poda, com uma solução de 1:10 de hipoclorito de sódio (água sanitária / água) (ODU et al., 2006).

Para evitar a inclusão de viroses no campo de plantio, é necessário o uso de túberas-semente sadias. A introdução precoce do vírus na cultura permite a sua dispersão para plantas nos estádios iniciais de desenvolvimento, o que acarreta danos maiores, pois quanto mais jovem a planta é infectada, maiores são os prejuízos (JAMES et al., 2011).

Em teoria é possível afirmar que a eliminação de todas as fontes de vírus de uma área, antes do início da nova plantação, tenha um efeito benéfico significativo no controle da doença. Na prática, todavia, essa tarefa é difícil, senão impossível de ser executada, especialmente em regiões de clima tropical e subtropical com uma ampla gama de espécies vegetais presentes na área durante quase o ano inteiro. A eficácia dessa medida está diretamente ligada a gama de hospedeiras do vírus, podendo ter maior chance de êxito quando o vírus tem círculo de hospedeiros restrito. É aconselhável, portanto, antes de iniciar um novo plantio, por meio da semeadura direta ou do transplante de mudas, eliminar culturas velhas e/ou abandonadas e restos de cultura que possam hospedar vírus que afetam a nova cultura. Nas proximidades da área de plantio, sempre que possível, deve-se eliminar plantas invasoras que podem alojar vírus e/ou vetores do vírus. O cultivo escalonado deve ser evitado, pois os plantios mais velhos sempre servirão de fonte de inóculo para as plantas mais novas (SANTOS, 2006).

A resistência genética é considerada a melhor e mais eficiente forma de controle de viroses e deve ser utilizada sempre que disponível.

A produção de plantas em laboratório por cultura de meristema pode proporcionar a obtenção de plantas sadias (SANTOS, 2006).

A diagnose precisa de uma doença é um requisito essencial para a recomendação de medidas de controle. O ideal é que um teste diagnóstico proporcione resultados rápidos e precisos com baixo custo, o que geralmente não acontece na prática (KENYON et al., 2012).

Esse trabalho teve como objetivo identificar as viroses presentes em inhame (*Dioscorea rotundata*) no Recôncavo da Bahia.

REFERÊNCIAS

- ABRAMO, M.A. **Taioba, cará e inhame**. São Paulo: Ícone, 1990, 80p.
- AMUSA, N.A., ADEGBITE, A.A., MUHAMMED, S. & BAIYWU, R.A. Yam diseases and its management in Nigeria. **African Journal of Biotechnology**, v.2, n.12, p.497-502, 2003.
- ÁVILA, A. C.; GAMA, M. I. C. S.; KITAJIMA, E. W. Detecção de um *Potyvirus* em inhame (*Dioscorea* spp.) no Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, DF, v.7, n.1, p.447-452, 1982.
- ALEMAN-VERDAGUER M. E. G.-U. C.; DUBERN, J.; BEACHY, R.N.; FAUQUET, C. Analysis of the sequence diversity of the P1, HC, P3, NIb and CP genomic regions of several yam mosaic *potyvirus* isolates: implications for the intraspecies molecular diversity of *potyviruses*. **Journal of General Virology**, South Africa, v.78, p.1253-1264, 1997.
- ANDRADE, G. P.; SILVA, A. K. S.; FILLOUX, D.; PIO-RIBEIRO, G.; KITAJIMA, E. W.; XAVIER, D. M. Planta de *Dioscorea alata* infectada com YMMV no estado de Pernambuco. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, DF, v.31, p.S 344, 2006. (Resumo).
- ASIEDU R, SARTIE A Crops that feed the World 1. Yams: Yams for income and foodsecurity. Food Security. Nigeria, v.2, p.305-315, 2010.
- BOUSALEM, M.; DOUZERY, E. J. P.; FARGETTE, M. High genetic diversity, distant phylogenetic relationships and intraspecies recombination events among natural populations of Yam mosaic virus: a contribution to understanding *potyvirus* evolution. **Journal of General Virology**, Seal, v.81, p.243-255, 2000.
- CASTILLO-URQUIZA G. P. (2008) Diversidade e estrutura genética de begomovírus em duas regiões produtoras de tomate do Sudeste do Brasil.

(Tese D.S.). Dep. de Fitopatologia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG. 107p.

COOK, A. A. **Diseases of tropical and sub tropical vegetables and other plants**. New York: Hafner Press, 1978. 381p.

DE KOCHKO A., VERDAGUER,B., TAYLOR,N., CARCAMO,R., BEACHY,R.N. AND FAUQUET,C. Cassava vein mosaic virus (CsVMV), type species for a new genus of plant double stranded DNA viruses, **Archives of Virology**, v.143, p.945-962, 1998.

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

FAO. FAOSTAT (2011). Disponível em: <<http://faostat.fao.org/default.aspx>>. Acesso em: 19 Set. 2013.

FERNANDES FR, ALBUQUERQUE LC, GIORDANO LB, BOITEUX LS, ÁVILA AC, INOUE- NAGATA AK Diversity and prevalence of Brazilian bipartite begomovirus species associated to tomatoes. *Virus Genes*, v.36, p.251-258. 2008.

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

GEERING A. D. W., HULL R. Family *Caulimoviridae*. In: King AMQ, Adams MJ, Carstens EB, Lefkowitz, EJ (Eds.). *Virus Taxonomy*. 9th Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. London UK. **Elsevier Academic Press**, p.429-443, 2012.

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

IBGE. Base de dados. Disponível em:<<http://www.ibge.org.br>>. Acesso em 23 Fevereiro. 2014.

INOUE-NAGATA, A. K.; ALBUQUERQUE, L. C.; ROCHA, W. B.; NAGATA, T. A simple method for cloning the complete begomovirus genome using the bacteriophage phi 29 DNA polymerase. **Journal of Virological Methods**, v.116, p.209-211, 2004.

IPGRI/IITA. Descriptors for Yam (*Dioscorea* spp.). Rome, Italy: International Institute of Tropical Agriculture, Ibadan, Nigeria International Plant Genetic Resources Institute, 1997, 61p.

JAMES AP, GEIJSKES RJ, DALE JL, HARDING RM Development of a Novel Rolling-Circle Amplification Technique to Detect Banana streak virus that also Discriminates. Between Integrated and Episomal Virus Sequences. *Plant Disease*, v.95, p.57-62, 2011.

JONES, A. T.; MCGAVIN, W.J. Improved PCR detection of Blackcurrant reversion virus in *Ribes* and further evidence that it is the causal agent of reversion disease. **Plant Disease**, Van den Bergh, v.86, p.1333-1338, 2002.

KENYON, L.; SHOYINKA, S. A.; HUGHES, J. D'A.; ODU, B. O. An overview of viruses infecting *Dioscorea* yams in Sub-Saharan Africa. In: J.d'A. Hughes, and B.O. Odu. **Plant Virology in Sub - Saharan Africa**, p.432-439, 2001.

KENYON L., LEBAS B. S. M., SEAL S. E. Yams (*Dioscorea* spp.) from the South Pacific Islands contain many novel *badnaviruses*: Implications for international movement of yam germplasm. **Archives of Virology, Sub - Saharan Africa**, v.153, p.877-889, 2008.

KING, A. M. Q.; ADAMS, M. J.; CARSTENS, E. B.; LEFKOWITZ, E. J. **Virus taxonomy**. Ninth Report of the International committee on Taxonomy of Viruses. Amsterdam. Elsevier. 2012.

KUMAR J, KUMAR A, ROY JK, TULI R, KHAN JA Identification and molecular characterization of Begomovirus and associated satellite DNA molecules infecting *Cyamopsis tetragonoloba*. *Virus Genes*, v.41, v.118-125, 2010.

LEBOT, V., Tropical root and tuber crops: cassava, sweet potato, yams and aroids. Crop production science in horticulture (17), CAB books, CABI, Wallingford, UK, 2009.

LHEUREUX F, LABOUREAU N, MULLER E, LOCKHART BEL, ISKRA-CARUANA ML Molecular characterisation of banana streak acuminata Vietnam virus isolated from *Musa acuminata* siamea (banana cultivar). **Archives Virology**, v.152, p.1409-1416(2007).

SANTOS, E. S.; MACÊDO, L. S. Tendências e potencialidades da cultura do Inhame (*Dioscorea* sp.) no Nordeste do Brasil, João Pessoa, PB, 2006. Disponível em: <http://www.emepa.org.br/> php Acesso em: 12 Março de 2014.

MALAUURIE, B.; TROUSLOT, M-F.; BERTHAUD, J.; BOUSALEM, M.; PINEL, A.; DUBERN, J. Medium-term and long-term *in vitro* conservation and safe international exchange of yam (*Dioscorea* spp.) germplasm. **EJBElectronic Journal of biotechnology**, London, v.1, n.3, p.1-15, 1998.

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

MIGLIORI, A.; CADILHAC, B. Contribution to the study of a virus disease of yam: *Dioscorea trifida* in Guadeloupe. **Annals of Phytopathology**, v.8, p.73-78, 1976.

MOHAMED, K. A.; MANTELL, S. H. Incidence of virus symptoms in yam (*Dioscorea* sp.) foliage in the commonwealth Caribbean. **Tropical Agriculture, Caribe**, v.53, p.255-261, 1976.

MOURA, R. M. Doenças do inhame da Costa. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; BERGAMIN-FILHO, A. E.; CAMARGO, L. E. A. (Ed.) **Manual de Fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. 4ª ed. v.2, p.415-419, 2005.

MUMFORD, R. A., SEAL, S. E. Rapid Single-tube immunocapture RT-PCR for the detection of two yam *potyviruses*. **Journal of Virological Methods**, Amsterdam, v.69, p.73-79, 1997.

ODU, B. O.; ASIYEDU, R.; SHOYINKA, S. A.; HUGHES, J. D. A. Screening of water yam (*Dioscorea alata* L) genotypes for reactions to viruses in Nigeria. **Journal of Phytopathology**, Nigeria, v.154, p.716-724, 2006.

OLIVEIRA, I.S.; LUZ, EDMN; BEZERRA, J.L.; MOUZA, R.M.; TORRES, G.R.C.; MAIA, LC.. Severidade da podridão-verde em inhames e especialização fisiológica de *Penicillium sclerotigenum*. **Fitopatologia Brasileira**, Pernambuco, Brasil, v.31, p.094-098, 2006.

PAPROTKA T, BOITEUX LS, FONSECA MEN, RESENDE RO, JESKE H, FARIA JC, RIBEIRO SG Genomic diversity of sweet potato geminiviruses in a Brazilian germplasm bank. **Virus Research**, v.149, p.224-233, 2010.

PEIXOTO NETO, P.A.S.; LOPES FILHO, J.; CAETANO, L.C.; ALENCAR, L.M.C.; LEMOS; E.E.B. **Inhame: o Nordeste fértil**. Maceió, AL: EDUFAL, 2000. 88p.

PHILLIPS, S.; BRIDDON, R. W.; BRUNT, A.; HULL, R. The Partial Characterization of a *Badnavirus* Infecting the Greater Asiatic or Water Yam (*Dioscorea alata*). **Journal of Phytopathology**, v.147, p.265-269, 1999.

PIO-RIBEIRO, G., ANDRADE, G.P., FILOUX, D., VERNIER, P., MELO-FILHO, P.A., ALMEIDA, H.S.M. & XAVIER, A.S. Plantas de inhame em Pernambuco e Paraíba apresentam infecções simples e mista por potyvírus e badnavírus. **Fitopatologia Brasileira**, Pernambuco, Brasil, v.31, p.309, 2006.

RITZINGER, C.H.S.P.; SANTOS FILHO, H.P.; ABREU, K.C.L.M.; FANCELLI, M.; RITZINGER, R. Aspectos fitossanitários da cultura do inhame. Cruz das Almas. **EMBRAPA/SP**, 2003, 39p.

SEAL, S. & MULLER, E. Molecular analysis of a full-length sequence of a new yam *badnavirus* from *Dioscorea sasibarensis*. **Archives of Virology**, v.152, n.4, p.829-832, 2007.

SANTOS, E. S. Manejo sustentável da cultura do inhame. (*Dioscorea* sp.) no Nordeste do Brasil, João Pessoa, PB, 2006. Disponível em: <http://www.emepa.br/php>, Acesso em: 18 Set. 2013.

SEGNOU CA.. Studies on the reproductive biology of white yam (*Dioscorea rotundata* Poir.). *Euphytica*, v.64, p.197-203, 1992.

SILVA, S.J.C.; CASTILLO-URQUIZA, G.P.; HORA-JÚNIOR, B.T.; ASSUNÇÃO, I.P.; LIMA, G.S.A.; PIO-RIBEIRO, G.; MIZUBUTI, E.S.G.; ZERBINI, F.M. Species diversity, phylogeny and genetic variability of begomovirus populations infecting leguminous weeds in Northeastern Brazil. **Plant Pathology**, in press, 2011.

SILVA, E. K. C. E. ; NASCIMENTO, A. V. S. ; COUTINHO, A. E. ; RESENDE, L. V.; Luciane Vilela. **Avaliação da resistência em população f3 oriunda do**

cruzamento cnc-0434 x ipa-206 de feijão-caupi ao mosaico severo. Revista Caatinga (UFERSA. Impresso), v.25, p.199-203, 2012.

SOUTO, E. R.; TESSMAN, D. J.; NUNES, W. N. C. Métodos de PCR aplicados à Fitopatologia. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, DF, v.27, p.22-46, 2000.

TERRY, E. R. Incidence, symptomatology, and transmission of a yam virus in Nigeria. In: Proceedings of the 4th Symposium of the International Society for Tropical Root Crops. Cali, Ed. J. COCK, R. MCINTYRE e M. GRAHAM, p.170-173, August 1976.

THOUVENEL, J. C.; DUMONT, R. An epidemiological approach to the study of yam mosaic viruses in the Ivory Coast. Proc. Int. Soc. **Tropical Root Crops**, v.45, p.643-649, 1988.

THOUVENEL, J. C.; FAUQUET, C. Yam mosaic, a *potyvirus* infecting *Dioscorea cayenensis* in the Ivory Coast. **Annals of Applied Biology**, v.93, n.4, p.279-283, 1979.

YANG, I. C.; HAFNER, G.J.; DALE, J.L.; HARDING, R. M. Genomic characterisation of taro bacilliform virus. **Archives of Virology**, v.148, p.937-949, 2003.

ZERBINI, F. M.; CARVALHO, M. G.; ZAMBOLIM, E. M. **Introdução à virologia vegetal.** UFV, 2002. 145p.

CAPÍTULO II

**DETECÇÃO MOLECULAR DE ESPECIES DE *YAM MOSAIC VIRUS* E
BADNAVIRUS QUE INFECTAM INHAME (*Dioscorea rotundata*)
CULTIVADO NO RECÔNCAVO DA BAHIA.**

1 **DETECÇÃO MOLECULAR DE VIROSES EM INHAME (*Dioscorea rotundata*)**
2 **CULTIVADO NO RECÔNCAVO DA BAHIA¹**

3
4 Danilo Pereira Costa⁽¹⁾, Sebastião de Oliveira e Silva⁽¹⁾, Paulo Ernesto Meissner Filho⁽²⁾,
5 Emanuel Felipe Medeiros Abreu⁽²⁾.

6
7 ⁽¹⁾Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias,
8 Ambientais e Biológicas, Rua Rui Barbosa, no 710, Centro, CEP 44380-000 Cruz das
9 Almas, BA, Brasil. E-mail: danilocosta_1739@hotmail.com, ssilva3000@gmail.com.

10 ⁽²⁾Embrapa Mandioca e Fruticultura, Caixa Postal 7, CEP 44380-000, Cruz das Almas,
11 BA. E-mail: Paulo.meissner@embrapa.br, emmanuel.abreu@embrapa.br.

12
13 **RESUMO** – O objetivo deste trabalho foi identificar as viroses presentes em inhame
14 (*Dioscorea rotundata*) no Recôncavo da Bahia. Foram coletadas túberas de 40 plantas
15 com e sem sintomas de viroses nos municípios de São Felipe, Maragojipe, São Félix,
16 Cruz das Almas. Para a detecção de *Badnavirus* o DNA total foi extraído seguindo a
17 metodologia de Kamal Sharma (2009) com adaptações, realizando-se em seguida a
18 RCA e a reação da PCR. Para a extração do RNA dos vírus do mosaico do inhame (*Yam*
19 *mosaic virus* - YMV) e do mosaico suave do inhame (*Yam mild mosaic vírus* - YMMV)
20 foi utilizada a metodologia de Gambino (2008) com adaptações, em seguida foi
21 realizada a RT-PCR. Para *Badnavirus* detectou-se uma banda de 580 pb. Na RT-PCR
22 para YMV obteve-se um fragmento de 586 pb. O YMMV não foi detectado em
23 nenhuma das amostras analisadas. Os fragmentos genômicos obtidos foram
24 sequenciados e caracterizados e, apresentaram alta identidade com espécies do gênero
25 *Badnavirus* e com o YMV. Desta forma, foi comprovada a presença de um *Badnavirus*
26 (92% de semelhança com o isolado DBV_GH03_Dr - AM072664.1) e do YMV (97%
27 de identidade com os isolados YMV capa proteica DrGha4) nas amostras coletadas em
28 inhame cultivado no Recôncavo da Bahia.

29
30 Termos para indexação: vírus, *Yam mosaic virus*, *Badnavirus*, sequenciamento, PCR,
31 RT-PCR.

32 ¹ Manuscrito submetido ao comitê editorial da Revista Brasileira de Pesquisa Agropecuária - PAB

33 ABSTRACT – This work aimed at identifying viral diseases associated with yam
34 (*Dioscorea rotundata*) crop in the Recôncavo of Bahia. Tubers were collected from 40
35 plants with and without viral symptoms in the municipalities of São Felipe, Maragojipe,
36 São Félix and Cruz das Almas. *Badnavirus* was detected by total DNA extraction,
37 according to Kamal Sharma (2009) methodology with adaptations, followed by rolling
38 circle amplification (RCA) and polymerase chain reaction (PCR). For yam mosaic virus
39 (YMV) and yam mild mosaic virus (YMMV) the methodology by Gambino (2008) with
40 modifications was used followed by RT-PCR. A band of 580 bp was found for
41 *Badnavirus*. The Gambino (2008) method allowed amplifying a fragment of 586 bp
42 corresponding to YMV, while there was no amplification for YMMV. The genomic
43 fragments were sequenced and characterized, showing identity with species of
44 *Badnavirus* and YMV. The presence of *Badnavirus* (92% similarity to isolate
45 DBV_GH03_Dr - AM072664.1) and YMV (97% similarity to YMV protein cap
46 DrGha4) was confirmed. Therefore, the *Potyvirus* YMV and a *Badnavirus* were found
47 in samples of yam tubers cultivated in Bahia.

48

49 Index terms: virus, *yam mosaic virus*, *Badnavirus*, sequencing, PCR, RT-PCR.

50

51

Introdução

52

53 O inhame (*Dioscorea* spp.) é uma planta trepadeira, monocotiledônea da família
54 *Dioscoreaceae*. Já foram descritas cerca de 600 espécies desse gênero, destacando-se
55 entre elas *D. rotundata* Poir., *D. alata* L., *D. cayennensis* Lam., *D. esculenta* (Lour.)
56 Burk. e *D. trifida* L. por produzirem túberas comestíveis (Santos, 1996).

57

58 Segundo estimativas da FAO (2012) foram cultivados em 2009 no mundo cerca
59 de 4,7 milhões de hectares de inhame, que geraram 49,2 milhões de toneladas de
60 túberas. O Continente Africano é o maior produtor de *Dioscorea* e responde por 96% da
61 produção mundial. Na África destacam-se como grandes produtores, Gana, Costa do
Marfim e Nigéria, os quais são responsáveis por 85% do inhame produzido no mundo,

62 em especial, a Nigéria com produção em 2010, de 29 milhões de toneladas (FAOSTAT,
63 2012).

64 De acordo com o censo agropecuário brasileiro, a região Nordeste foi
65 responsável pela produção de 164.000 toneladas de inhame (IBGE, 2010). As espécies
66 de inhame de maior aceitação no mercado são a *Dioscorea alata* e *Dioscorea rotundata*,
67 pela sua grande importância socioeconômica, principalmente para a região Nordeste do
68 Brasil, sobretudo para os Estados da Paraíba, Pernambuco, Alagoas, Bahia e Maranhão.
69 Ela é uma cultura geradora de renda e de empregos, porque exige bastante mão-de-obra
70 durante o seu cultivo, fortalecendo a agricultura familiar e auxilia na permanência da
71 família no campo (Santos, 2006). No entanto, usa-se uma baixa tecnologia na condução
72 da cultura, inclusive o emprego de túberas semente infectadas com vírus, o que
73 compromete os plantios posteriores. A presença de viroses constitui-se em um dos
74 principais fatores limitantes para a produção de inhame (Oliveira et al., 2006, Silva ET
75 AL., 2012).

76 As viroses ocorrem em diferentes espécies de inhame em todas as regiões em
77 que a cultura foi estabelecida (Seal & Muller, 2007). Já foram relatados em inhame
78 vírus dos gêneros *Potyvirus*, *Badnavirus*, *Potexvirus*, *Maculavirus*, *Comovirus* e
79 *Cucumovirus* (Lebot, 2009).

80 Os sintomas associados a doenças causadas por vírus variam dependendo do
81 agente envolvido, mas em geral incluem: clorose foliar severa, mosaico, cordão-de-
82 sapato, clareamento das nervuras, clorose internerval, nanismo e distorção foliar. Estes
83 sintomas levam a uma redução na capacidade fotossintética da planta infectada com
84 efeitos deletérios sobre a produção, qualidade das túberas e em algumas situações
85 causam a morte das plantas (Andrade et al., 2006). Essas plantas frequentemente estão

86 infectadas por mais de um vírus, o que dificulta a identificação da espécie presente e
87 acentua os sintomas da doença e as perdas na produção.

88 Esse trabalho teve como objetivo avaliar as viroses presentes em inhame
89 (*Dioscorea rotundata*) cultivado no Recôncavo da Bahia.

90

91 **Material e Métodos**

92

93 Em área de produtores de inhame foram selecionadas plantas, com idade de seis
94 a sete meses, que apresentavam sintomas característicos da infecção por viroses (clorose
95 foliar, mosaico, clareamento das nervuras e distorção na folha) e plantas sem sintomas
96 (Figura 1).

97 Foram coletadas túberas de 40 plantas de inhame provenientes de quatro locais,
98 sendo quinze amostras de Cruz das Almas (cinco amostras de Toá, cinco de Combê e
99 cinco amostras de Três Bocas), dez amostras de Maragogipe, dez amostras de São Felipe
100 e 5 amostras de São Félix.

101 As túberas coletadas foram armazenadas e após sua germinação foram plantadas
102 em sacos de polietileno contendo substrato em casa-de-vegetação. Depois que as mudas
103 emitiram os primeiros pares de folhas (um mês), foram iniciadas as indexações em
104 laboratório.

105

106

107

108

109

110

111 **Detecção molecular de *Badnavirus***

112

113 Na análise para *Badnavirus* a extração de DNA foi feita com base no protocolo
114 de Kamal Sharma (2009), adaptado no qual foram utilizados 10.000 *G* por 10 min em
115 todas as centrifugações.

116 Para o RCA foi usado 3 μL de DNA + 1 μL de tampão NEB do kit biolab 10X +
117 2 μL do BSA + 1 μL dNTP (10 mM) + 2 μL primer randômico (5 mM), em seguida
118 levado para banho-maria a 95 °C por três minutos e depois a 4 °C por 2 minutos. Depois
119 adicionou 0,2 μL da Fhi – DNA polimerase. Em seguida a reação foi incubada a 30 °C
120 por 24 horas e em seguida a 65 °C por 10 minutos (Johne et al., 2009).

121 Na PCR foi usado 2 μL do DNA (50 ng) + 2,5 μL tampão buffer 10X da Taq +
122 1,2 μL MgCl₂ (50 mM) + 1 μL de cada par de primers (10 mM) Badna FP e Badna RP,
123 0,2 μL de Taq Polimerase (0,2 U), 1 μL de dNTP (10 mM) + 16,1 μL de água (Tabela
124 1).

125 Esta reação foi levada ao termociclador com o seguinte programa: 94 °C por 3
126 minutos, 94 °C por 30 segundos, 65 °C por 30 segundos, 72 °C por 1,5 minutos, 72 °C
127 por 10 minutos e 4 °C/ ∞ em 35 ciclos (Andrade et al., 2006).

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

132

133

134

135

136 **Tabela 1:** Primers usados para amplificação de *Badnavirus*.

Primer	Orientação	Sequência (5' - 3')
BADNA FP*	Forward	ATGCCITTYGGIITIAARAAYGCICC
BADNA RP*	Reverse	CCAYTTRCAIACISCICCCCAICC

137 * Primers utilizados por Yang et al., 2003.

138

139 **Detecção molecular de *Potyvirus***

140

141 Para a extração de RNA das plantas de inhame foram testadas as seguintes
142 metodologias: Kit de Extração de RNA Total Axygen, Easyzol e Gambino (2008).

143 No protocolo do Easyzol a centrifugação foi alterada para 15.000 *G* por três
144 minutos. Na metodologia de Gambino (2008) utilizou-se 100 mg de amostra e após a
145 incubação realizou-se uma centrifugação de 15.500 *G* por 20 minutos.

146 No RT-PCR, adicionou-se a cada tubo 13 µL de RNA total na concentração de
147 50 ng, 1 µL de oligo dT (10 mM) e 1 µL do *primer* randômico (10 mM) que foi
148 incubado por cinco minutos a 70 °C e em seguida dois minutos à 4 °C. Em seguida
149 adicionou-se 5 µL da M-MLV buffer 5X + 1 µL de dNTP (10 mM) + 1 µL RNase out
150 + 1 µL da enzima M-MLV (1 U) + 2 µL de água tratada com DEPC, de acordo com o
151 kit da M-MLV. Sendo que para a detecção do YMV utilizou-se 2 µL do cDNA + 2,5 µL
152 tampão buffer 10X do kit invitrogen + 1,2 µL MgCl₂ (50 mM) + 1 µL de cada par de
153 primers específicos (10 mM) (YMV CP 1F e YMV UTR 1R) (YANG et al., 2003), 0,2
154 µL de Taq Polimerase (0,2 U), 1 µL de dNTP (10 mM) + 16,1 µL de água. Para o
155 YMMV foi usado 2 µL do cDNA + 2,5 µL tampão buffer 10X do kit invitrogen + 1,2
156 µL MgCl₂ (50 mM) + 1 µL de cada par de primers específicos (10mM) para YMMV CP

157 2F e YMMV UTR 1R (YANG et al., 2003), 0,2 µL de Taq Polimerase (0,2 U), 1 µL de
158 dNTP (10 mM) + 16,1 µL de água (Tabela 2).

159

160 **Tabela 2:** Primers usados para amplificação de *Potyvirus*.

Primer	Orientação	Sequência (5' - 3')
YMV CP 1F*	Forward	ATCCGGGATGTGGACAATGA
YMV UTR 1R*	Reverse	TGGTCCTCCGCCACATCAAA
YMMV CP 2F*	Forward	GGCACACATGCAAATGAAAGC
YMMV UTR 1R*	Reverse	CACCAGTAGAGTGAACATAG

161 * Primers utilizados por Munford; Seal (1997).

162

163 A PCR para os YMV foi realizada com as seguintes condições de amplificação:
164 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
165 uma extensão final de 10 min a 72 °C. Já para os YMMV as condições foram às
166 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
167 72 °C, com uma extensão final de 10 min a 72 °C. As amostras foram amplificadas em
168 termociclador PTC100 (MJ Research) e os fragmentos de DNA visualizados em gel de
169 agarose 1%, corado com brometo de etídeo, sob luz ultravioleta segundo Yang et al.
170 2003, com adaptações. O controle positivo para o YMV foi obtido de uma amostra que
171 após a PCR foi sequenciada pela MacroGem, tendo apresentando alta identidade com o
172 YMV.

173

174

175

176

177 Sequenciamento e análise filogenética

178

179 Os produtos obtidos na PCR para o *Badnavirus* e YMV, foram purificados
180 utilizando o kit GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification (GE Healthcare). O
181 sequenciamento foi realizado pela Macrogen Inc. (Seul, Coréia do Sul) diretamente dos
182 produtos de PCR purificados. Foram utilizadas para o sequenciamento três amostras de
183 YMV e uma amostra do *Badnavirus*. As sequências de nucleotídeos foram inicialmente
184 submetidas ao programa Seqassem (www.sequentix.de/software_seqassem.php), para
185 ajustar a fita de DNA sintetizada e ao algoritmo BLASTn, para a pesquisa da atribuição
186 preliminar das espécies com base no nível limite de 80% estabelecido pelo Comitê
187 Internacional de Taxonomia Viral - ICTV (Fauquet et al., 2005). As sequências foram
188 alinhadas utilizando o programa Clustal W (www.ebi.ac.uk/Clustalw) e submetidas ao
189 programa MEGA 5 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) (Tamura, 2011).

190 As sequências de nucleotídeos foram comparadas com sequências de *Potyvirus* e
191 *Badnavirus* disponíveis no GenBank: DBV_GH03_Dr (AM072664.1), DREV_S1d2Dr
192 (KF829965.1), *Piper yellow mottle virus*, Pymv_poliproteína (DQ836237.1), *Banana*
193 *streak virus*, BSV_26 (FJ594904.1), (www.ncbi.nlm.nih.gov/GenBank).

194 Alinhamentos múltiplos foram obtidos utilizando-se o programa Blastn
195 ([http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch](http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome)
196 [h&LINK_LOC=blasthome](http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome)) e procedeu-se a construção de uma árvore utilizando-se o
197 programa MEGA 5.1 (www.megasoftware.net), usando o método Neighbour-Joining. A
198 árvore filogenética foi construída a partir de análise de máxima verossimilhança com
199 “bootstrapping” de 10.000 repetições, pelo método Kimura 2 – paramétric, Pairwise
200 deletion. As sequências obtidas foram comparadas com as disponíveis no GenBank
201 (Tabela 3 e 4).

Resultados e Discussão

202

203

204 Identificação dos isolados virais

205

206 Verificou-se a presença do YMV e de um *Badnavirus* em 100% das amostras
207 coletadas no Recôncavo da Bahia. O YMMV não foi detectado em nenhuma das
208 amostras avaliadas.

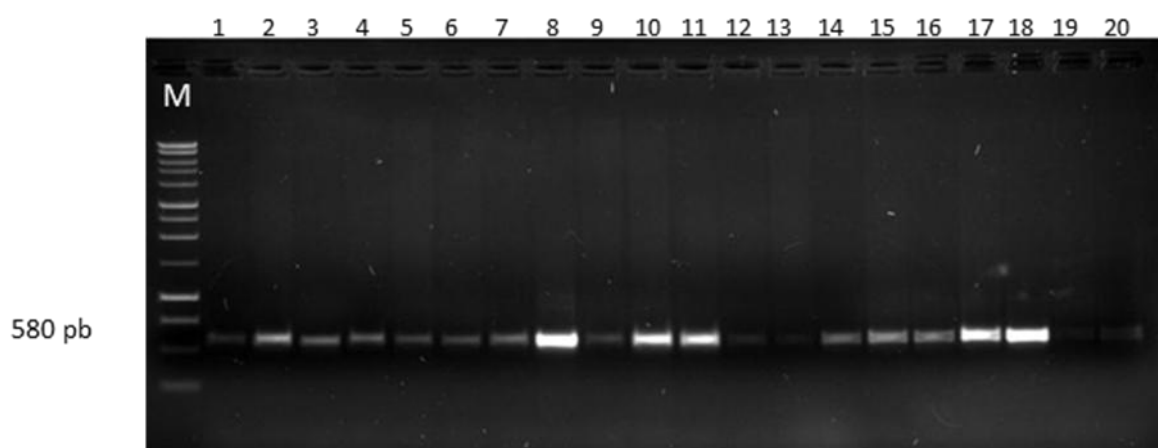
209

210 PCR do *Badnavirus*

211

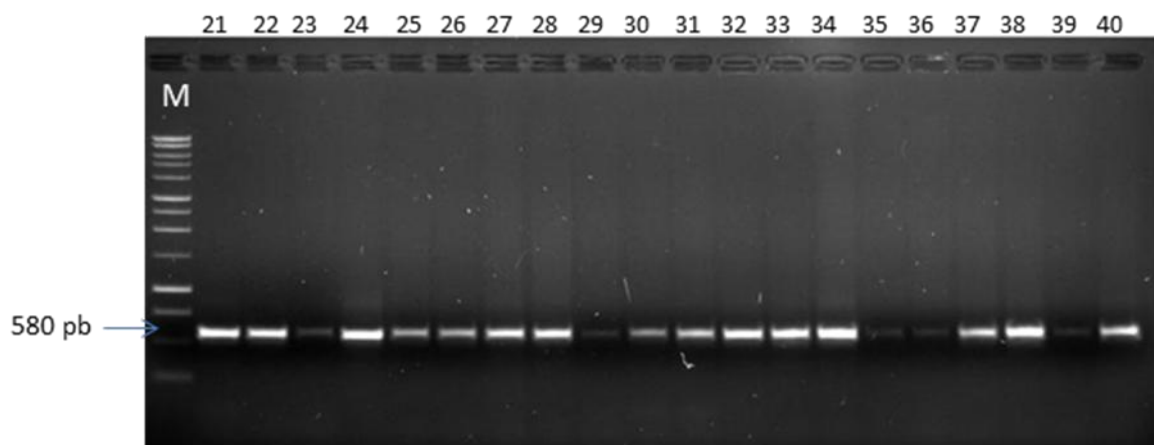
212 Com os primers BADNA FP/BADNA RP foi possível a amplificação de
213 fragmentos com tamanho de aproximadamente 580 pb, (Figura 2). Nas amostras 12, 13,
214 19 e 29 foram observadas bandas mais fracas, que não são claramente visíveis na figura
215 2.

216



217

218



219

220 **Figura 2:** Padrão eletroforético em gel de agarose (1%) de amplicons obtidos a partir de
 221 amostras de DNA total, extraídas de 40 amostras foliares de inhame. **M:** marcador (1
 222 Kb DNA ladder); **1 a 40:** Isolados de inhame coletados no Recôncavo da Bahia com
 223 suspeita de *Badnavirus*, sendo a amostra 24 considerada controle positivo.

224

225 *Badnavirus* foi encontrado em *D. rotundata* cultivado no Nordeste brasileiro
 226 (Andrade et al., 2006), inclusive na Região de Cruz das Almas, BA. A presença dessa
 227 virose em todas as amostras analisadas nesse estudo, deve-se provavelmente à
 228 proximidade geográfica das áreas amostradas e a constante troca de túberas semente
 229 entre os agricultores, o que acarreta a disseminação do vírus.

230 A comparação da sequência parciais da região da ORF III do isolado de
 231 badnavirus, observou-se 92% de similaridade com a sequência do isolado
 232 DBV_GH03_Dr (AM072664.1) disponível no GenBank.

233 Atualmente, os critérios adotados pelo ICTV para a delimitação de novas
 234 espécies dentro do gênero *Badnavirus* baseiam-se na identidade de 80% das sequências
 235 de aminoácidos do gene da poliproteína e 85% de identidade das sequências de
 236 nucleotídeos do genoma completo (ICTV, 2009). Porém, comparações realizadas com a
 237 porção genômica de aminoácidos do gene da poliproteína revelam que esta região é a

238 mais adequada para a identificação de espécie, principalmente quando não se dispõe do
239 genoma completo e apenas uma porção do genoma sequenciada (Bousalem et al., 2008).

240

241 **Análise das sequências e filogenia do *Badnavirus***

242

243 A sequência nucleotídica obtida foi alinhada com outras sequências de
244 *Badnavirus* depositadas no GenBank e submetidas à análise filogenética. Agrupamentos
245 foram selecionados para refletir as diferenças de nucleotídeos de 20% na região
246 RT/RNaseH, sendo este um critério para a demarcação de espécies do gênero
247 *Badnavirus* (ICTV, 2009). As análises de nucleotídeos mostraram que as sequências
248 virais provenientes de inhame, amostrado no Recôncavo da Bahia, apresentaram pela
249 PASC (Pairwise sequence comparison) alta identidade (90 a 92%) comparadas as
250 amostras do GenBank.

251 As análises de máxima verossimilhança resultaram em árvores com topologias
252 semelhantes, apresentando um ramo monofilético significativamente suportado pelos
253 valores de *bootstrap*. As sequências formaram dois agrupamentos, sendo o grupo 1
254 constituído por 23 sequências com as espécies *Dioscorea rotundata endogenous virus* -
255 DREV, *Dioscorea bacilliform virus* - DBV e *Dioscorea bacilliform virus A* - DBVA e o
256 grupo 2 por seis sequências das espécies de *Dioscorea bacilliform virus* - DBV, *Banana*
257 *streak virus* - BSV, *Commelina yellow mottle virus* - CoYMV, *Citrus yellow mosaic*
258 *virus* - CyMV, *Piper yellow mottle virus* - PYMV e *Taro bacilliform virus* - TBV
259 (Figura 3).

260 Foi possível observar no agrupamento filogenético 1, que o isolado CMF 198_
261 BADNA está mais próximo do DBVA (isolados Bn452Dpr e Bn243Dr) e

262 DBV1(isolado_NG01_Dr), indicando uma correlação entre as sequências e a
263 distribuição geográfica dos isolados.

264 Portanto, com esses resultados, confirmou-se que o isolado em estudo é um
265 *Badnavirus*, o que concorda com os resultados publicados por Lima et al. (2013) que
266 relatam o *Badnavirus* é uma das espécies mais importantes de vírus que causa
267 retardamento no crescimento, queda de produção e prejuízo para o produtor de inhame.

268 Para a demarcação de espécies do gênero *Badnavirus*, selecionou-se a amostra
269 em estudo que foi comparada com aquelas disponíveis no GenBank de modo a refletir
270 as diferenças de nucleotídeos da região RT/RNaseH (Harper et al., 2005). Nas análises
271 de nucleotídeos das sequências virais provenientes de inhame do Recôncavo da Bahia
272 foram divididas em grupos, onde, o isolado em estudo agrupa com DBV, DBVA e
273 DREV no grupo I, onde a PASC (Pairwise sequence comparison) mostrou alta
274 identidade de sequências (90 a 92%) e o outro no grupo II, agrupa com a espécie tipo e
275 espécie que podem ser utilizadas em consócio com o inhame. A presença de *Badnavirus*
276 foi também relatada em trabalhos anteriores conduzidos na região Nordeste (Edgar,
277 2004).

278 Na região genômica encontrada no sequenciamento (gene da poliproteína),
279 provavelmente não foi possível associar comportamento biológico do isolado viral com
280 sua proximidade nos ramos da árvore filogenética, uma vez que o isolado
281 CMF198_BADNA, manteve-se em grupos distintos com a espécie tipo do *Badnavirus*
282 disponível no GenBank. Apesar de serem da mesma espécie, o CMF198_BADNA e o
283 DBVC_Bn192DrDom (*Dioscorea bacilliform virus* C isolado Bn192DrDom), estão em
284 grupos deferentes embora tenham comportamento biológico semelhantes (Figura 3).

285

286

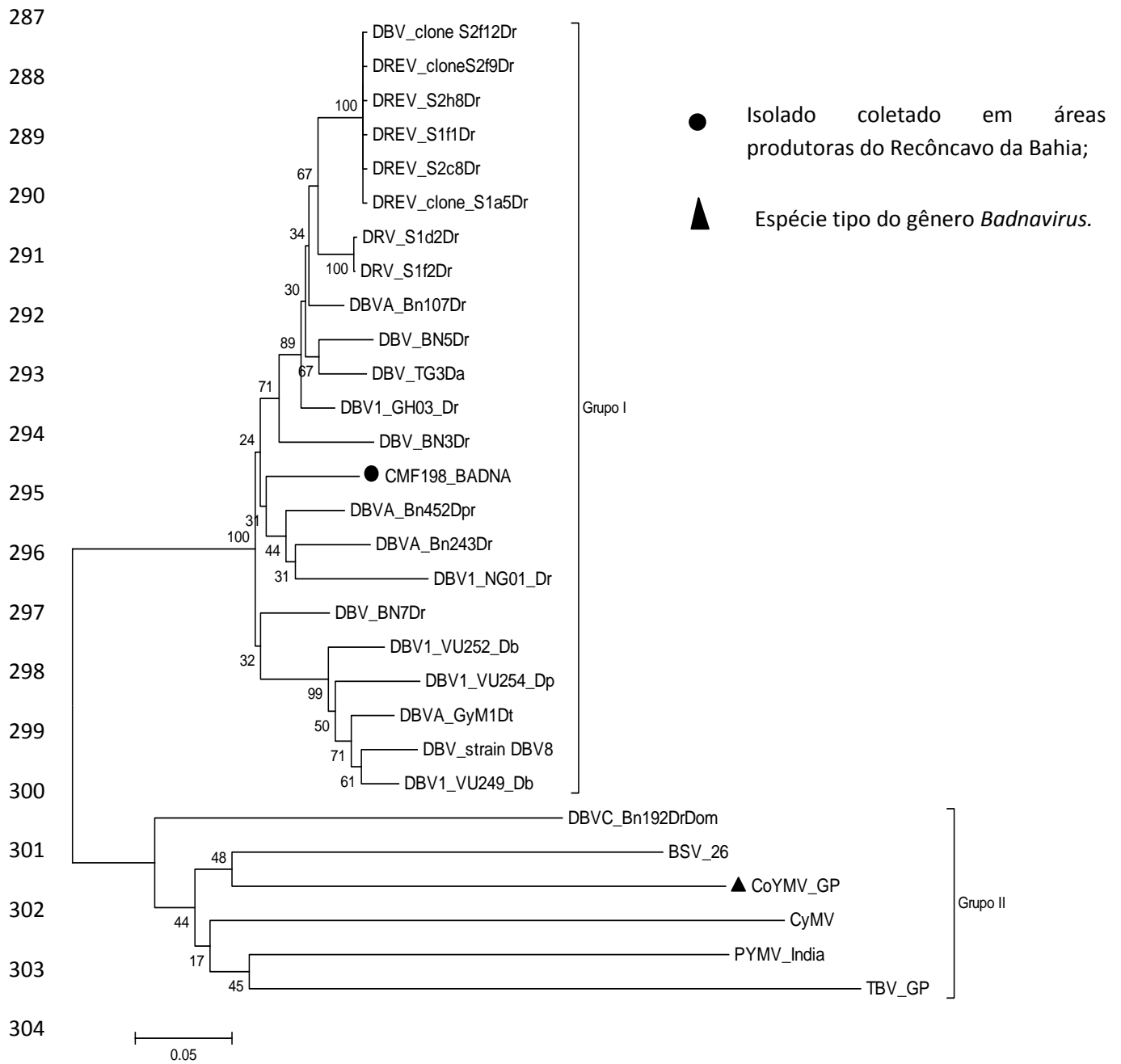


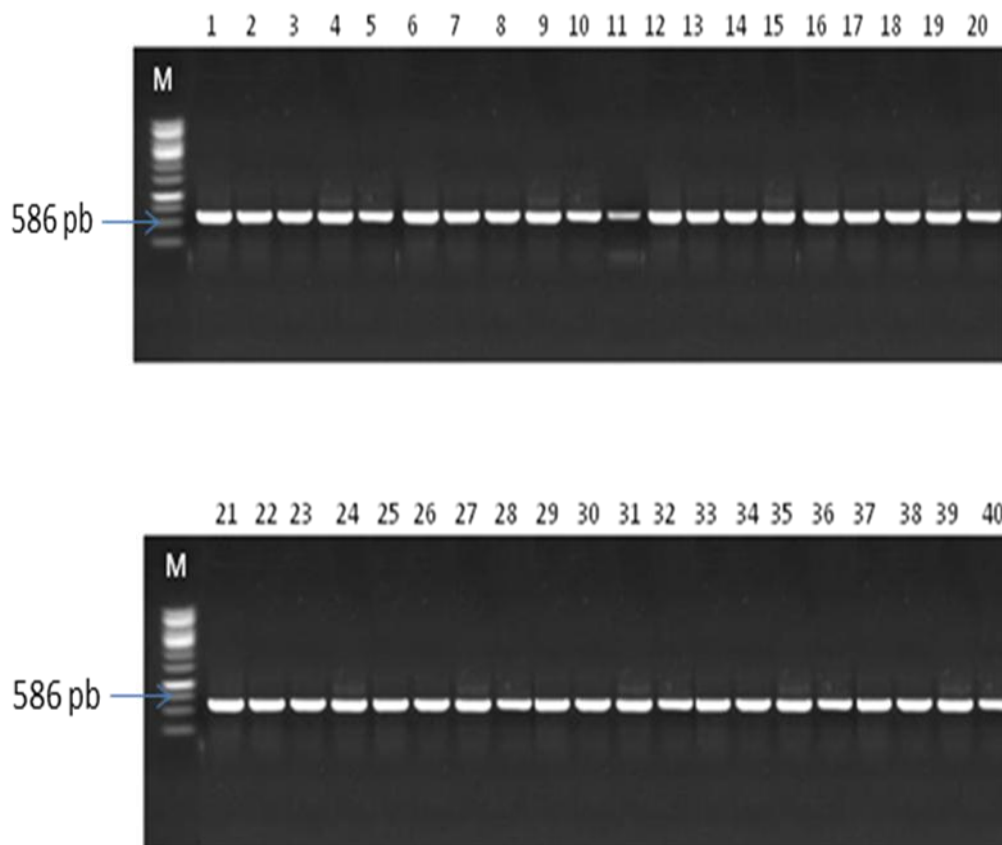
FIGURA 3 - Árvore de máxima verossimilhança baseada nas sequências parciais de *Badnavirus* e sequências referência depositadas no GenBank.

312 **PCR para *Potyvirus***

313

314 Para o gênero *Potyvirus* todas as amostras analisadas foram ajustadas para
315 concentração de 10 ng μL^{-1} , utilizando-se a temperatura de anelamento de 50 °C para o
316 YMMV e de 55 °C para o YMV.

317 Após ajustar as concentrações de RNA e temperaturas de anelamento para a
318 detecção dos vírus, foram analisadas as 40 amostras. Por meio da RT-PCR com os
319 primers (YMV CP 1F e UTR 1R) (Munford e Seal, 1997) foi obtido um fragmento de
320 aproximadamente 586 pares de bases (pb), detectando o YMV em todas as amostras
321 (Figura 4).



322

323

324

325

326 **FIGURA 4:** Padrão eletroforético em gel de agarose (1%) de amplicons obtidos a partir
327 de amostras de RNA total, extraídas de folhas de inhame. **M:** Marcador (1 Kb DNA

328 ladder); **1 a 40:** isolados de inhame coletados no Recôncavo da Bahia com suspeita
329 YMV utilizando concentração de 10 ng μL^{-1} de RNA no RT-PCR com temperatura de
330 anelamento de 55 °C.

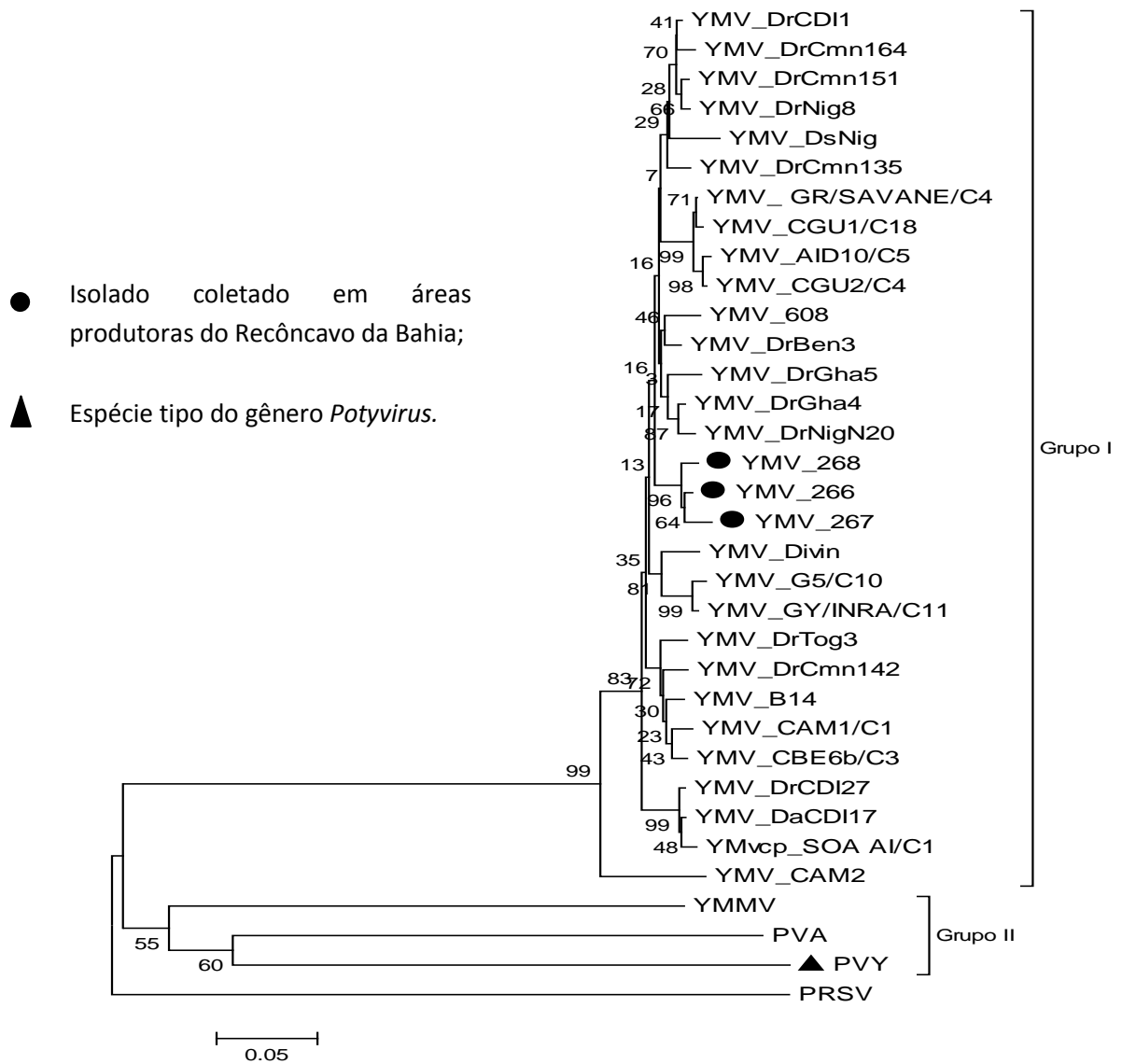
331

332 **Análise das sequências e filogenia do YMV**

333

334 As sequências do amplicons obtidas na PCR para o YMV, nas amostras 266 e
335 267, apresentaram 99% de identidade comparada entre elas, enquanto a amostra 266 em
336 relação a 268 apresentaram 97% de identidade comparadas entre elas, e todas
337 apresentando alta identidade com o gene da capa protéica do YMV (Figura 5).

338 Nas análises de nucleotídeos observou-se que as sequências do YMV
339 proveniente do Recôncavo da Bahia, podem ser divididas em dois grupos bem distintos:
340 O Grupo I agrupado com *Potyvirus* (YMV), que mostrou alta identidade de sequências
341 (88 a 97%) na comparação das amostras com aquelas disponíveis no GenBank.
342 Enquanto o Grupo II que se comportou como divergente (55 a 60% de identidade)
343 (Figura 5) agrupando a espécie tipo de *Potyvirus* e outros potyvirus, como o *Yam mild*
344 *mosaic virus* - YMMV, *Potatovirus A* - PVA, *Papaya ringspot virus* - PRSV.



345

346

347 **FIGURA 5** – Árvore de máxima verossimilhança baseada nas sequências parciais da
348 região da capa protéica (região 3' UTR) de *Potyvirus* e sequências referências
349 depositadas no GenBank, comparando os grupos formados com o vírus tipo e com
350 espécies do mesmo gênero.

351

352 Os acessos YMV 266, YMV 267 e YMV 268 apresentaram alta identidade com
353 os isolados de YMV disponíveis no GenBank, formando um grupo com 99% de

354 identidade entre ele, se comparados com o grupo II (YMMV, PVA e PVY) contendo a
355 espécie tipo de Potyvirus a espécie apresentando 55% de identidade.

356

357 **Discussões**

358

359 Kenyon et al. (2008) encontraram vários grupos divergentes de sequências de
360 *Badnavirus* referentes à região RT/RNaseH em amostras de inhame no Sul do Pacífico,
361 utilizando os mesmos pares de oligonucleotídeos utilizados nesse estudo. Evidenciando
362 a alta identidade entre sequências do mesmo grupo, presença de deleções de
363 aminoácidos e ORFs não funcionais.

364 Nas ampliações via RT-PCR utilizando um par de oligonucleotídeos para
365 *Potyvirus* nas amostras analisadas, verificou-se a presença de um fragmento de
366 aproximadamente 586 pares de bases. Para detecção do *Badnavirus*, foi obtido um
367 fragmento de 580 pares de bases, sendo que os resultados foram semelhantes aos
368 obtidos por Andrade et al. (2006) nas análises de *Potyvirus* e *Badnavirus* em inhame em
369 Alagoas, Pernambuco e Paraíba.

370 A comparação das sequências parciais dos isolados de *Badnavirus* e YMV
371 obtidos no Recôncavo da Bahia, confirmou a presença de *Badnavirus* com
372 aproximadamente 97% de identidade com os isolados disponível no GenBank (2013).
373 Foi detectada infecção mista por *Badnavirus* e YMV nas amostras de inhame coletadas
374 nos municípios do Recôncavo da Bahia.

375 Diversos fatores, incluindo a evolução de novas variantes do vírus, aparecimento
376 de vetores eficientes, mudanças climáticas, mudanças nos sistemas de cultivo, o
377 movimento de material de plantio infectado e introdução de variedades de plantas
378 suscetíveis têm isoladamente, ou em conjunto, contribuído para o surgimento de

379 problemas de *Badnavirus* e *Potyvirus* em todo o mundo. O uso de semente infectada ou
380 o plantio de semente sadia perto de plantios infectados favorecem a transmissão dos
381 vírus presentes no plantio já instalado para os novos plantios (Moura et al., 2006).

382

383 **Conclusões**

384

385 A metodologia proposta por Gambino (2008), com ajustes, permite extrair RNA
386 viral com qualidade;

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

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

391

392 **Referências**

393

394 ALTSCHUL, S.F.; MADDEN, T.L.; SCHÄFFER, A.A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.;
395 MILLER, W.; LIPMAN, D.J. Gapped Blast and PSI-Blast: a new generation of protein
396 database search programs. **Nucleic Acids Research**, v.25, p.3389-3402, 1997.

397

398 ANDRADE, G.P.; SILVA, A.K.S.; FILLOUX, D.; PIO-RIBEIRO, G.; KITAJIMA,
399 E.W.; XAVIER, D.M. Plantas de *Dioscorea alata* infectada com YMMV no estado de
400 Pernambuco. **Fitopatologia Brasileira**, v.31, p.344, 2006.

401

402 BOUSALEM, M. DOUZERY E.J.P, SEAL, S.E. Molecular taxonomy, phylogeny, and
403 evolution of plant reverse transcribing viruses (*Caulimoviridae*) inferred from the
404 reverse transcriptase sequences. **Archives Virology**, v.153, p.1085-1102, 2008.
405

406 CEREDA, M. P. Importância das tuberosas tropicais. In: CARMO, C.A.S. (Ed.)
407 **Inhame e taro: Sistema de produção familiar**. Espírito Santo, INCAPER, p.27-32,
408 2002.
409

410 DAHAL, G.O.R.; TENKOUANO, A.; HUGHES, J.A.; THOTTAPPILLY, G.;
411 VUYLSTEKE, D.; LOCKHART, E.B.L. Relationship between natural occurrence of
412 banana streak badnavirus and symptom expression, relative concentration of viral
413 antigen, and yield characteristics of some micropropagated *Musa* spp. **Plant Pathology**,
414 v.49, p.68-79, 2000.
415

416 EDGAR, R.C. MUSCLE: A multiple sequence alignment method with reduced time
417 and space complexity. **BMC Bioinformatics**, v.5, p.1-19, 2004.
418

419 ENI, A.O.; HUGHES J. D. A.; REY, M.E.C.; Survey of the incidence and distribution
420 of five viruses infecting yams in the major yam-producing zones in Benin. **Annals of**
421 **Applied Biology**, v.153, p.223–232, 2008.
422

423 FAO. FAOSTAT 2012. Disponível em:
424 <<http://faostat.fao.org/site/567/default.aspx#ancor>> Acesso em: 25 de set. 2013.
425

426 FAUQUET, C.; MAYO, M.; MANILOFF, J.; DESSELBERGER, U.; BALL, L. (Eds)
427 Virus taxonomy: Eighth Report of the International committee on Taxonomy of
428 Viruses. Elsevier/ Academic Press, London, 2005, p.1269.
429
430 GAYRAL, P.; ISKRA-CARUANA, M. Phylogeny of Banana streak virus reveals
431 recent and repetitive endogenization in the genome of its host (*Musa* sp.). **Journal of**
432 **Molecular Evolution**, v.69, p.65-80, 2009.
433
434 GAMBINO, G.; PERRONE, I.; GRIBAUDO, I.A. Rapid and Effective Method for
435 RNA Extraction from Different Tissues of Grapevine and Other Woody Plants,
436 **Phytochemical Analysis**. v.19, p.520-525, 2008.
437
438 HARPER, G.; HART, D.; MOULT, S.; HULL, R.; GEERING, A.; THOMAS, J. The
439 diversity of Banana streak virus isolates in Uganda. **Archives of Virology**, v.150,
440 p.2407-2420, 2005.
441
442 HUGHES, J.D.A.; DONGO, L.; ATIRI, G.I. Viruses infecting cultivated yams
443 (*Dioscorea alata* 396 and *D. rotundata*) in Nigeria. **Phytopathology**, v.87, p.45, 1996.
444
445 IBGE. Base de dados de 2010. Produção de inhame. Disponível
446 em:<<http://www.ibge.org.br>>. Acesso em 23 Fevereiro. 2014.
447
448 ICTV. International Committe on Taxonomy of viruses. Taxonomy of family
449 Caulimovilidae and Potyviridae. Disponível em_

450 <<http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp?version=2009>>. Acesso em: dezembro
451 de 2013.

452

453 JAMES, A.P.; GEIJSKES, R.J.; DALE, J.L.; HARDING, R.M. Development of a
454 Novel Rolling- Circle Amplification Technique to Detect Banana streak virus that also
455 Discriminates Between Integrated and Episomal Virus Sequences. **Plant Disease**, v.95,
456 p.57-62, 2011.

457

458 JOHNE, R.; MÜLLER, H.; RECTOR, A.; VAN, R.M.; STEVENS, H. Rolling-circle
459 amplification of viral DNA genomes using phi29 polymerase. **Trends in Microbiology**,
460 v.17, p.205-211, 2009.

461

462 KAMAL SHARMA, K.; MISHRA, A.K.; MISRA, S.A simple and efficient method for
463 extraction of genomic DNA from tropical tuber crops. **African Journal of**
464 **Biotechnology**. v.7, p.1018-1022, 2008.

465

466 KENYON, L.; LEBAS, B.S.M.; SEAL, S.E. Yams (*Dioscorea* spp.) from the South
467 Pacific Islands contain many novel badnaviruses: implications for international
468 movement of yam germplasm. **Archives of Virology**, v.53, p.877-889, 2008.

469

470 LIMA, J.S.; LIMA, A.T.M.; CATILLO-URQUIZA, G.P.; SILVA, S.J.C.;
471 ASSUNÇÃO, I.P.; MICHEREFF, S.J.; ZERBINI, M.; LIMA, G.S.A. Variabilidade
472 genética de isolados de badnavírus infectando inhame (*Dioscorea* spp.) no nordeste do
473 Brasil. **Tropical Plant Pathology**, v.38, p.349-353, 2013.

474

475 MOURA, R. M.; OLIVEIRA, I. S.; TORRES, G. R. C. Primeiro Assinalamento de
476 *Scutellonema bradys* em *Dioscorea alata* no Brasil, Estabelecido no Estado de São
477 Paulo. **Fitopatologia Brasileira**, v.31, p.211-211, 2005.

478

479 MOURA, R. M. Problemas fitossanitários do inhame no Nordeste e proposta para um
480 sistema integrado de controle. In: In: SIMPÓSIO NACIONAL SOBRE AS
481 CULTURAS DO INHAME E DO TARO, 2., 2002, João Pessoa. **Anais**. UFPB, 2002.
482 p.68-72.

483

484 MUMFORD R.; SEAL S. Rapid Single-tube immunocapture RT-PCR for the detection
485 of two yam of potyviruses. **Jornal Virological Methods**. v.69, p.73-79, 1997.

486

487 OLATUNDE, O. J.; **Viruses of Yam in Ghana**. Greenwich: UK, 1999. 33p. Tese
488 (Mestrado). University of Greenwich, U.K.

489

490 OLIVEIRA, I.S; LUZ, E.; BEZERRA, J.L.; MOUZA, R.M.; TORRES, G.R.C.; MAIA,
491 L.C. Severidade da podridão-verde em inhames e especialização fisiológica de
492 *Penicillium sclerotigenum*. **Fitopatologia Brasileira**, v.31, p.094-098, 2006.

493

494 PEIXOTO NETO, P.A.S.; LOPES FILHO, J.; CAETANO, L.C.; ALENCAR, L.M.C.;
495 LEMOS, E.E.P. **Inhame: O Nordeste Fértil**. Maceió: Edufal, 2000, 88p.

496

497 PHILLIPS, R.W.; BRUNT, A.A.; HULL, R. The parcial characterization of a
498 Badanvirus infecting the greater Asiatic or Water yam (*Dioscorea alata*). **Journal of**
499 **Phytopathology**. v.147, p.434-439, 1999.

500 SANTOS, E.S. dos; **INHAME (Dioscorea sp) Aspectos Básicos da Cultura**. João
501 Pessoa: EMEPA-PB, SEBRAE,. 1996. 158p.

502

503 SANTOS, E.S. **Cultura do inhame (Dioscorea spp.)**. João Pessoa; EMEPA-PB,
504 SEBRAE, 2002, 9p.

505

506 SILVA, J.A.; OLIVEIRA, A.P.; ALVES, G.S.; CAVALCANTE, L.F.; OLIVEIRA,
507 A.N.P.; ARAÚJO, M.A.M. Rendimento do inhame adubado com esterco bovino e
508 biofertilizante no solo e na folha. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e**
509 **Ambiental**, v.16, p.253-257, 2012.

510

511 TAMURA, K.; PETERSON, D.; PETERSON, N.; STECHER, G.; NEI, M.; KUMAR,
512 S. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood,
513 Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. **Molecular Biology and**
514 **Evolution**. v.28, p.2731-2739, 2011.

515

516 YANG, I.C.; HAFNER, G.J.; REVILL, P.A.; DALE, J.L.; HARDING, R.M. Sequence
517 diversity of South Pacific isolates of Taro bacilloform virus and the development of a
518 PCR-based diagnostic test. **Archives of Virology**, v.148, p.1957-1968, 2003.

519

520

AGRADECIMENTOS

521

522 À CAPES pela concessão da bolsa de estudos e aos funcionários do Laboratório
523 de Virologia da Embrapa Mandioca e Fruticultura pelo auxílio, bem como pela estrutura
524 fornecida para a realização dos trabalhos. Ao Banco do Nordeste do Brasil (BNB) pelo

525 financiamento do projeto e a todos que contribuíram de forma direta e indireta para a
 526 realização desse trabalho.

527

528 **Tabela 3.** Informações de cada acesso utilizado na árvore filogenética para *Badnavirus*.

Acesso	Espécie	Hospedeiro	Sigla
AM072664.1	<i>Dioscorea bacilliform virus</i>	Inhame	DBV_GH03_Dr
KF829965.1	<i>Dioscorea rotundata endogenous virus</i>	Inhame	DREV_S1d2Dr
KF829971.1	<i>Dioscorea rotundata 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>Dioscorea rotundata endogenous virus</i>	Inhame	DREV_S1a5Dr
KF829996.1	<i>Dioscorea rotundata endogenous virus</i>	Inhame	DREV_S2h8Dr
KF829995.1	<i>Dioscorea rotundata endogenous virus</i>	Inhame	DREV_S2f12Dr
KF829994.1	<i>Dioscorea rotundata endogenous virus</i>	Inhame	DREV_S2f9Dr
KF829988.1	<i>Dioscorea rotundata endogenous virus</i>	Inhame	DREV_S2c8Dr
KF829970.1	<i>Dioscorea rotundata endogenous virus</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 streak virus</i>	Banana	BSV_26
AM072673.1	<i>Dioscorea bacilliform virus</i>	Inhame	DBV_NG01_Dr
AM072706.1	<i>Dioscorea bacilliform virus I</i>	Inhame	DBV_VU252
AM072707.1	<i>Dioscorea bacilliform virus I</i>	Inhame	DBVA_VU254_Dp
AM072705.1	<i>Dioscorea bacilliform virus</i>	Inhame	DBV_VU249_Db
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>Potatovirus A</i>	Inhame	PVA
NC_001616.1	<i>Potatovirus Y</i>	Inhame	PVY
NC_001785.1	<i>Papaya ringspot virus</i>	Inhame	PRSV

529
530

531 **Tabela 4.** 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

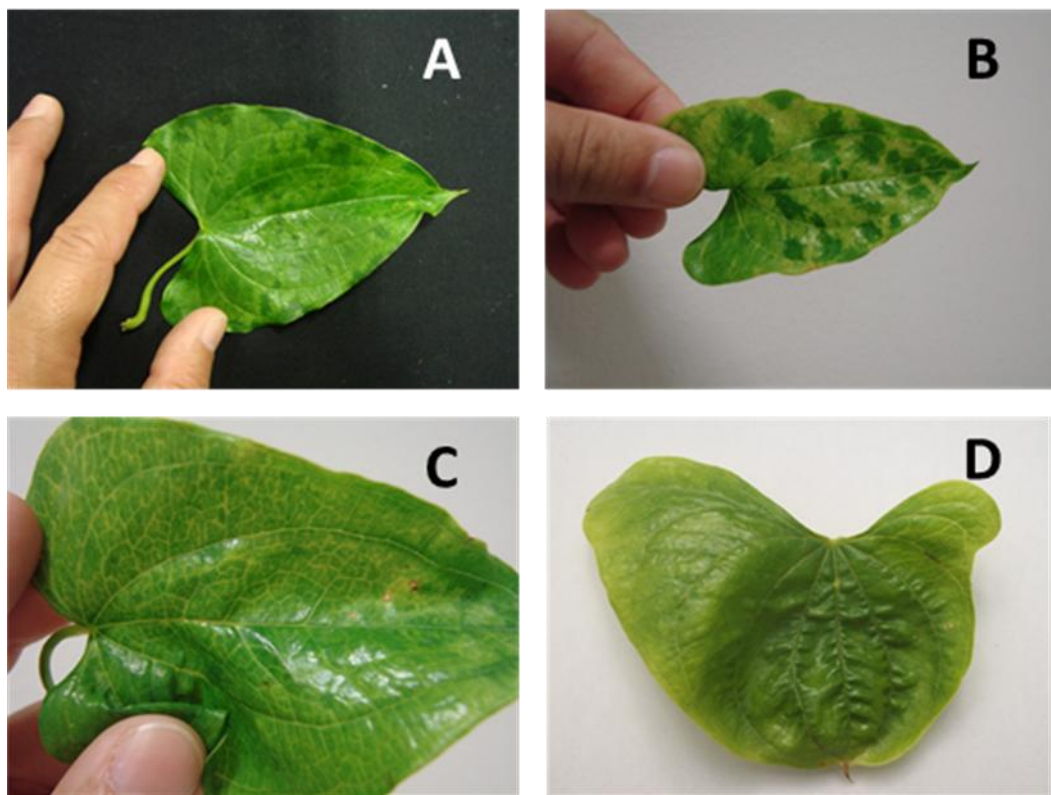
AJ305450.1	<i>Yam Mosaic virus</i>	Inhame	YMV_DrBen3
AJ305453.1	<i>Yam Mosaic virus</i>	Inhame	YMV_DaCDI17
NC_004039.1	<i>Potatovirus A</i>	Batata	PVA
NC_001616.1	<i>Potatovirus Y</i>	Batata	PVY
NC_001785.1	<i>Papaya ringspot virus</i>	Mamão	PRSV

532

533

534

535



536

537

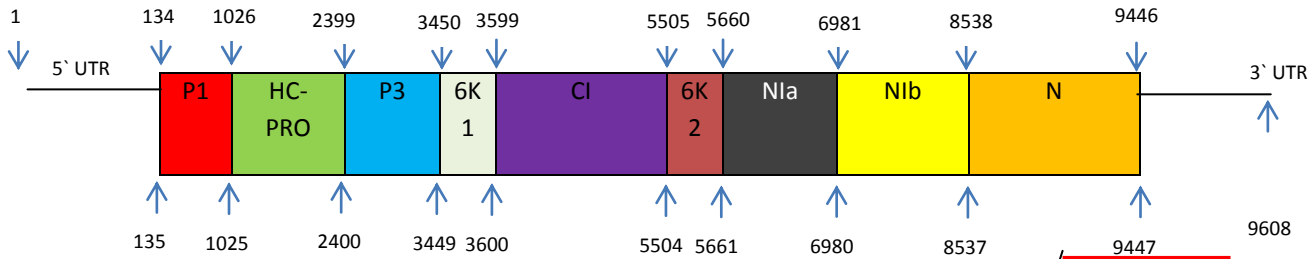
538 **Figura 1.** Plantas de *Dioscorea rotundata* apresentando sintomas semelhantes aos
 539 causados por viroses; A: mosaico, B: mosaico severo, C: Clareamento das nervuras, D:
 540 Deformação foliar.

541

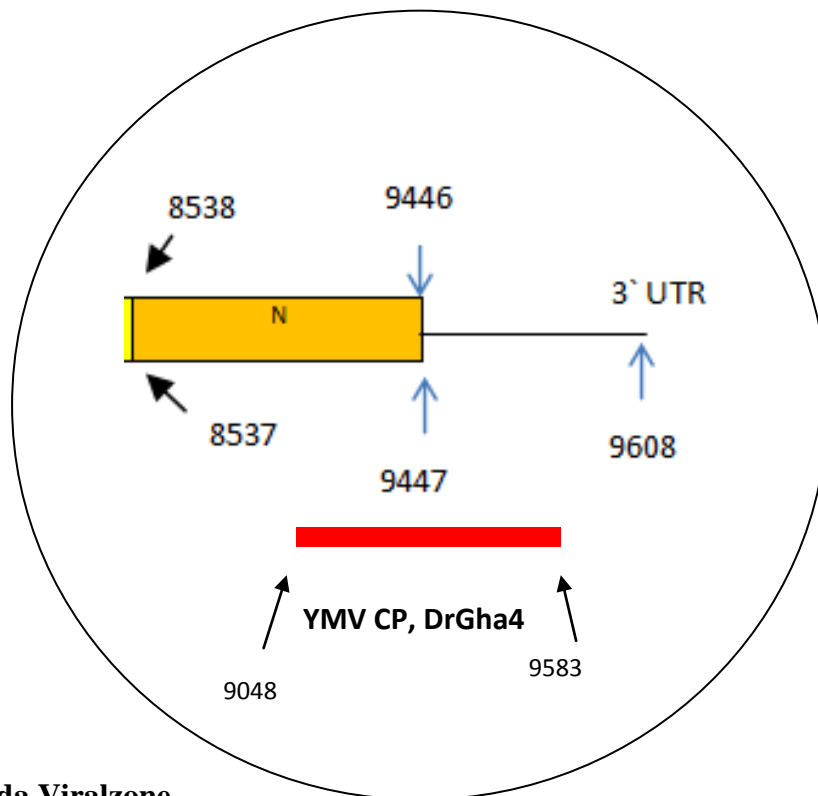
542

ANEXO I

FIGURA 2 (Capítulo I): Estrutura do genoma completo do *Yam mosaic virus*, identificando a localização de maior identidade com o isolado estudado.

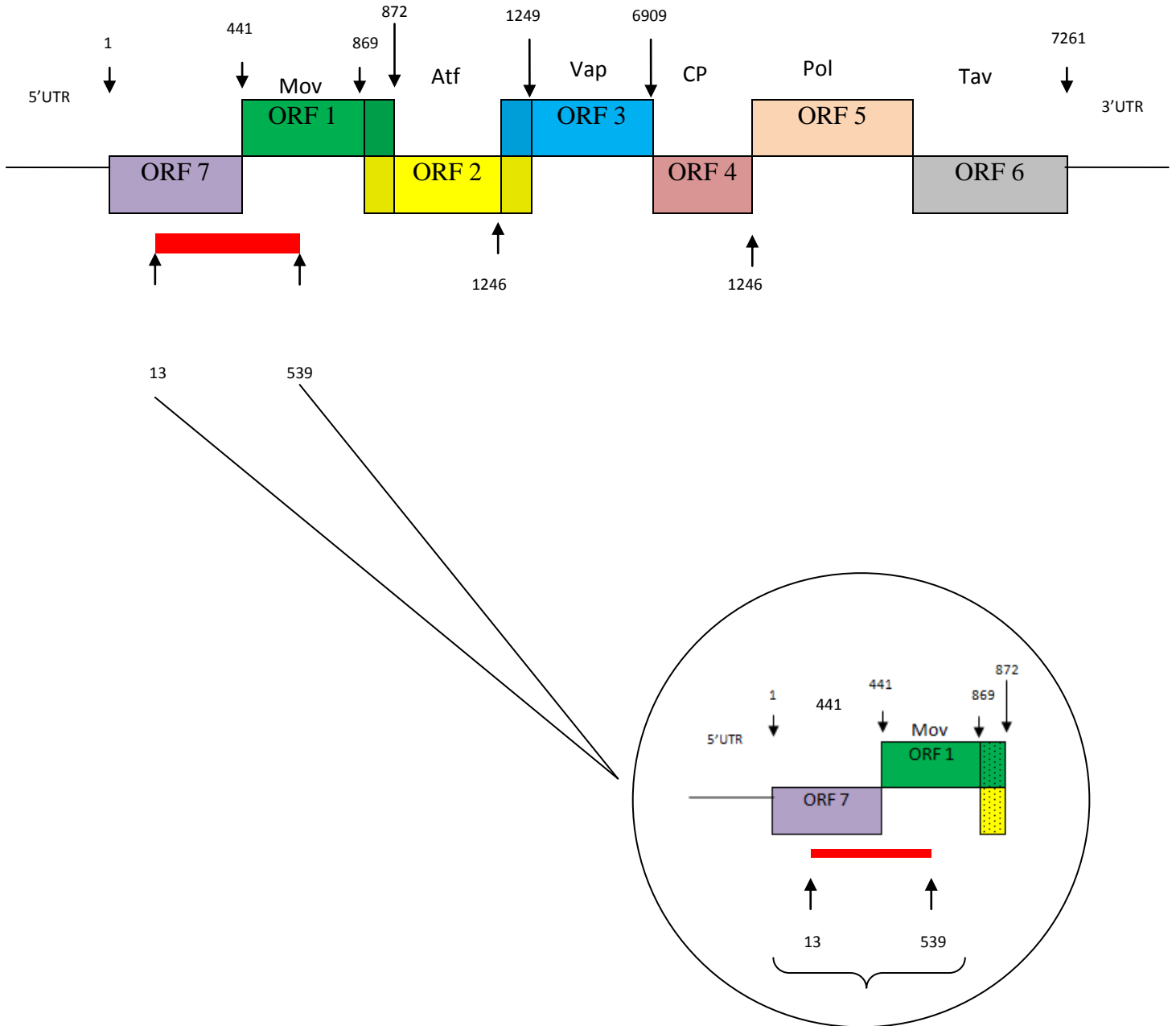


Yam mosaic virus partial CP gene for coat protein, genomic RNA, isolate DrGha4.



Fonte: Adaptado da Viralzone.

FIGURA 4 (Capítulo I): Estrutura do genoma completo do *Dioscorea baciliforme* vírus, identificando a região de maior identidade com o isolado em estudo.



Dioscorea rotundata endogenous virus eDBV8 clone S1d2Dr RT-RNase H domain gene, partial cds

Fonte: Adaptado da Viralzone.

PROTOCOLO 1: PARA EXTRAÇÃO DE DNA DE FOLHAS DE INHAME (MINI-PREP)

(Kamal Sharma, 2009)

SOLUÇÃO TAMPÃO DE EXTRAÇÃO

Soluções reagentes Final	[]	V; Final 100 mL
CTAB 10%	2,0 %	20,0 mL
NaCl 5 M	2,0 M	40,0 mL
Tris HCl 1M pH 8,0	0,1 M	10,0 mL
EDTA 0,5 M	0,02M	4,0 mL
2-mercaptoetanol	2,0 %	2,0mL
PVP (Polivinilpirrolidona)	2,0 %	2,0 g
H2O de milli-Q	q;s;p;	100,0 mL

* Adicionar na hora da extração de DNA (20 μ L 2-mercaptoetanol por mL de tampão)
OBS.: Todas as soluções devem ser preparadas na hora da extração.

Extração de DNA – PROCEDIMENTOS

1. Coletar as folhas de plantas, de preferência jovens e saudáveis, evitando-se áreas atacadas por pragas e doenças; No ato da coleta envolver as amostras em recipiente que as protejam da luz para evitar a fotossíntese e a produção de metabolitos secundários; As amostras deverão permanecer no escuro de 12 a 18 horas antes da extração de DNA;
2. Pesar 300 mg do tecido vegetal, usar almofariz na presença de nitrogênio líquido, macerar o tecido usando micro-pistilo;
3. Adicionar 1,0 mL da solução tampão de extração previamente aquecida (65 °C); Macerar novamente na presença do tampão na capela e esperar a mistura adquirir a forma líquida;
4. Transferir a mistura líquida com auxílio de uma espátula, para microtubos devidamente identificados (eppendorf 2,0 mL); Adicionar 5,0 μ L de proteinase K (10 mg mL⁻¹);
5. Colocar as amostras na estufa a 37 °C por 30 minutos, homogeneizar a cada 10 minutos;

6. Retirar da estufa e incubar os microtubos em banho-maria a 65 °C por 30 minutos, homogeneizar a cada 10 minutos;
7. Centrifugar 8.000 G (9.000 rpm) por 10 min;
8. Retirar o sobrenadante e transferir para novos tubos (eppendorf 2,0 mL);
9. Adicionar igual volume coletado à solução [fenol: clorofórmio: álcool-Isoamílico (25: 24: 1)], e misturar gentilmente (30 a 40) X;
10. Centrifugar 8.000 G (9.000 rpm) por 10 min;
11. Coletar o sobrenadante e transferir para novos tubos devidamente identificados (eppendorf 2,0 mL);
12. Adicionar ao sobrenadante 200 µL tampão (NaCl 2,0 M + PEG 4%) misturar por inversão;
13. Incubar as amostras durante 15 min a 4 °C;
14. Centrifugar 9.000 G (8.680 rpm) por 10 min;
15. Retirar o sobrenadante e transferir para novos tubos (eppendorf 1,5 mL)
16. Adicionar álcool Isopropílico (gelado), equivalente a aproximadamente 2/3 do volume coletado;
17. Pescar o DNA com auxílio de uma ponteira e transferir para novos tubos (eppendorf 1,5 mL);
18. Lavar o pellet duas vezes com o tampão de lavagem [Acetato de amônio 15 mM + Etanol 75% + TE (Tris-HCl 10 mM pH 8,0 + EDTA 1 mM pH 8,0)];
19. Secar o pellet em temperatura ambiente (para remoção do etanol);
20. Resuspender o pellet (50-70) µL de tampão [TE + RNase (10 mg mL⁻¹)];
21. Incubar na estufa 37 °C durante 60 minutos;
22. Conservar a solução estoque a -20 °C.

OBS.: Os tubos e ponteiras contaminados com fenol clorofórmio devem ser descartados em recipiente apropriado.

PROTOCOLO 2: EXTRAÇÃO DE RNA COM O USO DO EASYZOL

1. Homogeneização

A. Tecidos

Tecido animal ou de planta (tanto frescos quanto congelados à -70 °C até o uso) podem ser processados congelando com nitrogênio líquido e moendo até um pó fino, com auxílio de um pilão. Homogenize as amostras do tecido em 1 mL de EasyZol para 50-100 mg de tecido utilizando um homogeneizador.

2. Separação de Fase

Incube a amostra homogeneizada por 5 minutos a 15-30 °C para permitir a completa dissociação dos complexos nucleoproteicos. Adicione 0.2 mL de clorofórmio para 1 mL de EasyZol. Tampe os tubos com segurança. Agite os tubos vigorosamente a mão por 15 segundos e incube em temperatura ambiente durante 2 a 3 minutos. Centrifugue as amostras a 12.000 *G* durante 5 a 10 minutos a 4 °C. Após centrifugação, a mistura se separa em uma fase amarela, fase fenol-clorofórmio, uma interfase, e uma fase aquosa incolor no topo (sobrenadante). RNA fica exclusivamente na fase aquosa. O volume do sobrenadante é aproximadamente 60% do volume de EasyZol utilizado na homogeneização.

3. Precipitação do RNA

Transfira a fase aquosa para um novo tubo, e guarde a fase orgânica caso o isolamento de DNA ou proteína seja desejado. Precipite o RNA do sobrenadante misturando com álcool isopropílico. Use 0.5 mL de isopropanol para 1 mL de EasyZol utilizado na homogeneização inicial. Misture bem por inversão algumas vezes. Incube as amostras a 15-30 °C durante 10 minutos e centrifugue a 12.000 *G* durante 5 a 10 minutos à 4 °C. O RNA precipitado, geralmente invisível antes da centrifugação, forma um pellet com aspecto de gel na lateral e no fundo do tubo.

4. Lavagem do RNA

Descarte o sobrenadante, adicione 1 mL de Etanol a 75% (em água livre de RNA), não agite o precipitado. Gentilmente inverta o tubo algumas vezes para lavar o

tubo, centrifugue a 12.000 G durante 2 minutos à 4 °C, descarte o etanol e repita o processo.

5. Diluição do RNA

No fim do procedimento, seque o pellet de RNA brevemente (ar seco ou secador a vácuo durante 5 a 10 minutos). Não seque o RNA por centrifugação a vácuo. É importante não deixar o pellet de RNA secar completamente, pois isto acarretará em uma grande diminuição da sua solubilidade. Parcialmente dissolvidas, as amostras de RNA tem proporção A260/280 <1.6. Dissolva o RNA em água livre de RNase ou solução SDS a 0.5% passando a solução algumas vezes através da ponteira, e incubando durante 10 minutos à 55-60 °C. (Evite SDS se logo após o RNA for usado para reações enzimáticas). RNA também pode ser dissolvido em formamida 100% (deionizada). Armazene à -70 °C.

6. Armazenamento

Armazenar de 2-8 °C e protegido de luz. Produto estável por até 1 ano, quando armazenado corretamente.

PROTOCOLO 3: EXTRAÇÃO DE RNA CONFORME GAMBINO (2008)

Autoclavar todas as soluções e todos os utensílios usados na extração para inativação de RNAses.

Preparar todas as soluções com água DEPC a 1% (v/v).

1. Macerar 150 mg do tecido vegetal na presença de nitrogênio líquido;
2. Adicionar 900 µL da solução tampão de extração, pré-aquecida a 65 °C;
3. Incubar os tubos em banho-maria a 65 °C por 10 min;
4. Adicionar 900 µL de clorofórmio-álcool isoamil (24:1v/v) e homogeneizar vigorosamente;
5. Centrifugar a 11 000 *G* por 10 min a 4 °C;
6. Coletar o sobrenadante e transferir para novos tubos de 2 mL;
7. Repetir as etapas 4 e 5;
8. Coletar o sobrenadante e transferir para novos tubos de 1,5 mL;
9. Adicionar o mesmo volume do coletado de LiCl 3 M;
10. Incubar a mistura no gelo por 30 min;
11. Centrifugar a 21 000 *G* por 30 min a 4 °C;
12. Ressuspender o pellet em 500 µL de SSTE (pré-aquecido a 65 °C) ;
13. Adicionar 900 µL de clorofórmio-álcool isoamil (24:1v/v) e homogeneizar;
14. Centrifugar a 11 000 *G* por 10 min a 4 °C;
15. Coletar o sobrenadante e transferir para novos tubos de 1,5 mL;
16. Precipitar o RNA com 0,7 vols de isopropanol gelado e centrifugar a 21 000 *G* por 15 min a 4 °C, **imediatamente**.
17. Lavar o pellet com etanol (70%), deixar secar e ressuspender em água DEPC.

SOLUÇÕES

TAMPÃO DE EXTRAÇÃO MÉTODO CTAB.

2%CTAB, 2,5% PVP-40, 2 M NaCl, 100 mM Tris-HCl pH 8,0, 25 mM EDTA pH e 2% de β-mercaptoetanol.

TAMPÃO SSTE (PRE AQUECER ANTES DE USAR)

10 Mm Tris-HCl pH 8,0, 1 mM EDTA pH 8,0, 1% SDS, 1 M NaCl.

SOLUÇÃO DE LiCl 3 M.

PREPARO DAS SOLUÇÕES PARA EXTRAÇÃO DE DNA

➤ SOLUÇÃO TAMPÃO DE EXTRAÇÃO:

Soluções reagentes	[] Final (C2)	V. Final 100 mL		
CTAB 10%	2,0%	20,0 mL		
NaCl 5M	2,0 M	40 mL		
Tris HCl 1MpH 8,0	0,1 M	10 mL		
EDTA 0,5M	0,02 M	4,0 mL		
2-mercaptoetanol	2,0%	2,0 mL		
PVP (Polivinilpirrolidona)	2,0%	2,0 g		
H ₂ O milli-Q		100 mL		

Cálculos para **10 mL** de solução:

CTAB 10%

$$10\% = (10.1)/100 = 0,10$$

$$\begin{aligned} C1.V1 &= C2.V2 \\ 0,10.V1 &= 0,002.10 \\ V1 &= 2 \text{ mL} \end{aligned}$$

NaCl 5M

$$\begin{aligned} C1.V1 &= C2.V2 \\ 5.V1 &= 2.10 \\ V1 &= 4 \text{ mL} \end{aligned}$$

TRIS Hcl 1 M pH 8,0

$$\begin{aligned} C1.V1 &= C2.V2 \\ 1.V1 &= 0,1.10 \\ V1 &= 1 \text{ mL} \end{aligned}$$

EDTA 0,5 M

$$C1.V1=C2.V2$$
$$0,5.V1=0,02.10$$
$$V1=0,4 \text{ mL}$$

2-MERCAPTOETANOL 2%

2% de 10 mL

$$10. 2/100=0,2 \text{ mL (200 } \mu\text{L)}$$

PVP

2% de 10 mL

$$10.2/100=0,2 \text{ g}$$

Completa a solução com água até completar o volume desejado (10 mL).

$$2+4+1+0,4+0,2=7,8$$

$$10-7,8=2,2$$

Adiciona 2,2 mL de água na solução.

TAMPÃO CARBONATO (1L):

Na₂CO₃-----1,59 g (carbonato de sódio)

NaHCO₃-----2,39 g (bicarbonato de sódio)

H₂O destilada-----Completa para 1000 mL

Ajustar pH para “9,6”.

SOLUÇÃO DE LAVAGEM (NaCl 5 M + PEG 4%) PARA 5 mL:

NaCl 5 M

$$C1.V1=C2.V2$$

$$5.V1=2.5$$

$$V1=0,4 \text{ mL}$$

PEG 4% de 5 mL

4% de 5 mL

$$5.4/100=0,2 \text{ g}$$

NaCl 5 M + PEG 4%

$$2+0,2 = 2,2$$

Como eu quero um volume de solução de 5 mL, pego o volume que encontrei (2,2) e completo com água para 5 mL (acrescentando 2,8 mL de água).

PCR (INHAME)

cDNA-----	2,5 µL	} 2,5µL
Tampão 10X (PCR)-----	2,5 µL	
MgCl ₂ (50mM)-----	2,4 µL (2,4 para 25mM)	} 22,5µL
Primer R (3`)------	1 µL	
Primer F (5`)------	1 µL	
Taq Polimerase-----	0,2 µL	
H ₂ O-----	13,4 µL	} 25 µL
DNTP 2,5mM-----	2 µL	

Observação: Adiciona 22,5 µL do MIX + 2,5 µL do material genético, totalizando 25 µL.

1º PASSO: No gelo, em um novo tubo, adicione todos os reagentes, levando em conta que a Taq Polimerase, deve ser colocada no final por ser uma proteína de fácil degradação.

1	}	Oligo 01 YMMV CP 2F Oligo 02 YMMV UTR 1R	Tm = 50°C
2		}	Oligo 03 YMV CP 1F Oligo 04 YMV UTR 1R
3	}		Oligo 05 Badna FP Oligo 06 Badna RP

Tm = Temperatura

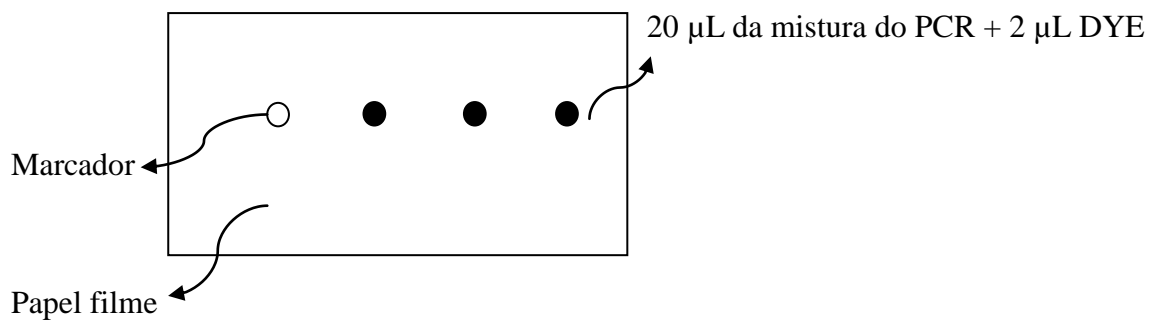
2º PASSO: Leva para o aparelho e configure as devidas temperaturas para cada Primer, por um tempo e proceder às devidas leituras em gel agarose.

3º PASSO: Preparar o gel agarose (NOVO) para correr a análise. (CUBA AZUL)

4º PASSO: Em um papel filme, espalhe em forma de ponto sequenciado 15 μ L das amostras oriundas do PCR, logo depois adicione 2 μ L de DYE.

5º PASSO: No 1º poço, colocar 10 μ L de 1 Kb (Padrão, controle).

6º PASSO: Retira com cuidado cada amostra do papel filme e coloque em cada poço, para correr o gel em 80 V por 30 minutos.



cDNA para vírus em inhame (Enzima M-MLV Promega)

1º PASSO: Adiciona em um tubo para cDNA, as seguintes concentrações para cada reagente utilizado para a análise.

RNA total-----13µL

Oligo dT-----1 µL

Random Primer-----1 µL

15 µL

2º PASSO: Após a adição de todos os reagentes, leve para o aparelho leitor de cDNA, sob uma temperatura de 70°C por 5 minutos. (PAUSE).

3º PASSO: Após este tempo, retire do aparelho e coloque diretamente no gelo 4°C por 2 minutos.

4º PASSO: Enquanto isso prepare o MIX.

M-MLV Buffer 5X-----5 µL (Tampão)

dNTP (10)-----1 µL

RNase out-----1 µL

M-MLV (Enzima)-----1 µL

H₂O -----2 µL

25 µL

5º PASSO: Adicione 10 µL do MIX ao tubo que está no gelo.

6º PASSO: Após colocar o Mix, leve para o aparelho de leitura de cDNA a uma temperatura de 37°C por 60 minutos.

7º PASSO: Após este período retire do aparelho e coloque direto no gelo. Logo então, armazenar no frízer.

ANEXO II

SEQUÊNCIAMENTO OBTIDOS DA MACROGEN (CORÉIA DO SUL) PARA AS AMOSTRAS COLETADAS NO RECÔNCAVO DA BAHIA.

➤ CMF266_YMV

GGACGGTGCGGAGCAAGTGAATATCCATTA AAAACCGATCATAGAGAATGC
CAAACCCACATTTTCGTCAGATAATGATGCATTTTCAGTGACGCAGCTGAAGC
GTACATTGAATTGCGGAACTCAAAGAACCGTACATGCCCCGATACGGTAT
TCAGCGCAATTTGAGGGATTACTCATTGGCCAGATATGCGTTCGATTTCTA
GAGATAACCTCTAAA ACTCCAGTTCGAGCGCGTGAAGCCCACCATCAGATG
AAGGCAGCAGCTATTGGAAACAAA ACTTACAAAATGTTTGGATTTGATGGC
AAAGTGGGTTCCCAGGAAGAGGATACAGAGAGACACGCTGCAGGTGATGT
CACGAAAGACATGCACAGCCTTTTAGGCATGAGAGGTATGTAGAGTGTTGG
TTATATATCAGATATATATAATTCTGTTATGCCTACCTAACATATGTCTGGT
TGCAAGCATTCTGTGCTTGTGAGAAGACGTATTCTAATGTTGCATTTTGGAG
GAACTCGAGAGTGTCGAGTGACACGGA

➤ CMF267_YMV

GGACGGTGCGGAGCAAGTGAATACCCATTA AAAACCGATCATAGAGAATGC
CAAACCCACATTTTCGTCAGATAATGATGCATTTTCAGTGACGCAGCTGAAGC
GTACATTGAATTGCGGAACTCAAAGAACCGTACATGCCCCGATACGGTAT
TCAGCGCAATTTGAGGGATTACTCATTGGCCAGATATGCGTTCGATTTTCTA
GAGATAACCTCTAAA ACTCCAGTTCGAGCGCGTGAAGCCCACCATCAGATG
AAAGCAGCAGCTATTGGAAACAAA ACTTACAAAATGTTTGGATTTGATGGC
AAAGTGGGTTCCCAGGAAGAGGATACAGAGAGACACGCTGCAGGTGATGT
CACGAAAGACATGCACAGCCTTTTAGGCATGAGAGGTATGTAGAGTGTTGG
TTATATATCAGATACATATAATTCTGTTATGCCTACCTAACATATGTTGGT
TGCAAGCATTCTGTGCTTGTGAGAAGACGTATTCTAATGTTGCATTTTGGAG
AAACTCGAGAGTGTCGATGACACCCGG

➤ CMF268_YMV

AAGTGAATATCCATTA AAAACCGATCATAGAGGAATGCCAAACCCACATT
TTCGTCAGATAATGATGCATTTTAGTGACGCAGCTGAAGCGTACATTGAATT
GCGGAACTCAAAGAACCGTACATGCCCCGATACGGTATTCAGCGCAATTT
GAGGGATTACTCATTGGCCAGATATGCGTTCGATTTCTAGAGATAACTTCT
AAA ACTCCAATTCGAGCGCGTGAAGCCCACCATCAGATGAAGGCAGCAGCT
ATTGGAAACAAA ACTTATAAAAATGTTTGGATTTGATGGCAAAGTGGGTTCC
CAGGAAGAGGATACAGAGAGACACGCTGCAGGTGATGTCACGAAAGACTT
GCACAGCCTCTTAGGCATGAGAGGTATGTAGAGTGTTGGTTATATATCCAG
ATATATATAATTCTGTTATGCCTACCTAACATATGTTGGTTGCAAGCAT
TTCTGTGCTTGTGAGAAGAACGTATTCTAATGTTGCATTTTGGAGAACTC
GAGAGTGTTTCGATGAC

➤ CMF198_BADNA

GGACGGTGCGGAGCAAGTGGAATATCCATTA AAAACCGATCATAGAGAATGC
CAAACCCACATTTTCGTCAGATAATGATGCATTTTCAGTGACGCAGCTGAAGC
GTACATTGAATTGCGGAACTCAAAGAACCGTACATGCCCCGATACGGTAT
TCAGCGCAATTTGAGGGATTACTCATTGGCCAGATATGCGTTCGATTTCTA
GAGATAACCTCTAAACTCCAGTTCGAGCGCGTGAAGCCCACCATCAGATG
AAGGCAGCAGCTATTGGAAACAAAACCTTACAAAATGTTTGGATTTGATGGC
AAAGTGGGTTCCCAGGAAGAGGATACAGAGAGACACGCTGCAGGTGATGT
CACGAAAGACATGCACAGCCTTTTAGGCATGAGAGGTATGTAGAGTGTTGG
TTATATATCAGATATATATAATCTGTATGCCTACCTAACATATGTCGGT
TGCAAGCATTCTGTGCTTGTGAGAAGACGTATTCTAATGTTGCATTTTGGAG
GAACTCGAGAGTGTCTGAATGACACGGAG