

GENIRA PEREIRA DE ANDRADE

**DIAGNÓSTICO FITOSSANITÁRIO DA CULTURA DO INHAME (*DIOSCOREA*
SPP.) EM ÁREAS PRODUTORAS DO NORDESTE DO BRASIL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do grau de Doutor em Fitopatologia.

RECIFE – PE, BRASIL

FEVEREIRO, 2007

**DIAGNÓSTICO FITOSSANITÁRIO DA CULTURA DO INHAME (*DIOSCOREA*
SPP.) EM ÁREAS PRODUTORAS DO NORDESTE DO BRASIL**

GENIRA PEREIRA DE ANDRADE

COMITÊ DE ORIENTAÇÃO

Prof^o Dr. Gilvan Pio Ribeiro - Orientador

Prof^a Dr^a Lilia Willadino – Co-orientadora

Prof^o Dr. Péricles de Albuquerque Melo Filho – Co-orientador

RECIFE – PE, BRASIL

FEVEREIRO, 2007

**DIAGNÓSTICO FITOSSANITÁRIO DA CULTURA DO INHAME (*DIOSCOREA*
SPP.) EM ÁREAS PRODUTORAS DO NORDESTE DO BRASIL**

GENIRA PEREIRA DE ANDRADE

Tese defendida e aprovada pela Banca Examinadora em 20 de março de 2007

ORIENTADOR:

Prof^o Dr. Gilvan Pio Ribeiro
(UFRPE)

EXAMINADORES:

Prof^a Dr^a Uided Maaze Tibúrcio Cavalcante
(UFPE)

Dr^a Roseane Cavalcanti dos Santos
(Embrapa Algodão)

Prof^a Dr^a Luiza Suely Sêmen Martins
(UFRPE)

Prof^a Dr^a Elineide Barbosa da Silveira
(UFRPE)

Prof^o Dr. Péricles de Albuquerque Melo Filho
(UFRPE)

RECIFE – PE, BRASIL

FEVEREIRO, 2007

Àquele que me dá a cada dia
oportunidade de resgatar a
sabedoria e a bondade como
entidade do Universo (DEUS)

AGRADEÇO

Aos meus pais Geni Pereira de Andrade (in
memorian) e Otaviano Dionízio de Andrade,
pela confiança, carinho, amor e
compreensão que me guiaram na vida

Aos meus irmãos, em especial a Osmar (in
memorian), Aldo Oldaci e Pedro Odair
Pereira de Andrade, pela colaboração
carinho e amizade

OFEREÇO

Ao meu filho Acácio Pereira de Andrade Farias,
pela paciência e colaboração em todos os
momentos

DEDICO

“Amarás o Senhor teu Deus, com todo
teu coração, com toda tua alma
e com toda a tua mente”
(Evg. S. Mateus 22: 37)

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela força, determinação e ânimo para perseverar diante dos obstáculos para alcançar a meta;

À Universidade Federal Rural de Pernambuco, e a Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia pela oportunidade de realização do Curso de Doutorado;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq, pelo apoio financeiro;

Ao Senhor Benoit Le Hir da Condado Agroexportadora Ltda e aos produtores de inhame dos Estados de Pernambuco e da Paraíba, em especial, aos senhores Clécio Lucena e Valdenir dos municípios de Conde - PB e São Joaquim do Monte – PE, respectivamente, pelo apoio concedido durante as coletas de material;

Aos Pesquisadores Philippe Vernier e Denis Filloux do “Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement” - CIRAD, pela colaboração nas atividades de campo e análises moleculares, respectivamente;

Ao Professor Gilvan Pio Ribeiro pelos ensinamentos, orientação, confiança, amizade e excelente exemplo de ética, integridade e profissionalismo a ser seguido;

À Dra. Roseane Cavalcanti dos Santos, Pesquisadora da Embrapa Algodão, e Dra. Ana Verônica Silva do Nascimento, pela preciosa colaboração e apoio;

Aos professores Romero Marinho de Moura, Maria Menezes, Rosa de Lima Ramos Mariano, Tânia de Arruda Falcão, Lilia Willadino e Péricles de Albuquerque Melo Filho pelos valiosos ensinamentos, incentivo, confiança, dedicação, amizade e exemplos de integridade e profissionalismo a serem seguidos;

A Ana Maria, Marcos e Regina Buccini Pio Ribeiro, pela confiança, amizade, especialmente pelo apoio incondicional nas várias fases da minha vida;

Aos amigos Robson José do Nascimento, Antonia Alice Costa Rodrigues, Maria Angélica Guimarães Barbosa e Adriana Melo pela saudável convivência, companheirismo, apoio e amizade no decorrer do Curso;

A toda equipe do Laboratório de Fitovirologia em especial a Amanda Soares, Diego Xavier e André Xavier, pela boa convivência, colaboração e amizade e ao estagiário Thiciano Miranda do Laboratório de Fitonematologia pela colaboração, apoio e amizade.

SUMÁRIO

	Páginas
AGRADECIMENTOS.....	vi
SUMÁRIO.....	viii
RESUMO.....	x
ABSTRACT.....	xii
CAPÍTULO I – INTRODUÇÃO GERAL.....	01
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	15
CAPÍTULO II – Análise dos principais problemas fitossanitários do inhamo em Pernambuco e Paraíba,	24
RESUMO.....	25
ABSTRACT.....	26
INTRODUÇÃO.....	31
MATERIAL E MÉTODOS.....	32
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	34
LITERATURA CITADA.....	36
CAPÍTULO III - Infecção simples e mista por duas espécies de potyvirus e um badnavirus em <i>Dioscorea</i> spp. no Nordeste do Brasil.....	45
RESUMO.....	46
ABSTRACT.....	47
INTRODUÇÃO.	48
MATERIAL E MÉTODOS.....	50
RESULTADOS E DISCUSSÃO..	54

AGRADECIMENTOS.....	58
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	58
CONCLUSÕES GERAIS	70

RESUMO

O inhame (*Dioscorea* spp.) tem sido afetado por a vários problemas fitossanitários, que se manifestam na lavoura e durante o transporte e/ou armazenamento. É uma cultura de elevada importância sócio-econômica para a região Nordeste do Brasil, inclusive com potencial de expansão via exportação de túberas, especialmente para a Europa. Foi efetuada uma avaliação do desenvolvimento de doenças e pragas em importantes áreas produtoras, bem como um estudo da qualidade do material de propagação utilizado pelos produtores. Foram visitados sete municípios de Pernambuco e três da Paraíba, totalizando 30 propriedades. Para avaliação da ocorrência das doenças da parte aérea e danos causados por lagarta, foram marcadas em cada campo, 5 fileiras de 10 plantas e mais 30 plantas, escolhidas aleatoriamente, para análise de viroses, as quais foram avaliadas um mês antes e no período da colheita. Para extração dos nematóides foi usado método de centrifugação rápida associado ao de Jenkins, os quais foram identificados por suas estruturas observadas ao microscópio ótico. Os fungos detectados foram isolados e identificados e observando-se suas estruturas reprodutivas. Para identificação dos vírus foram efetuadas observações ao microscópio eletrônico de transmissão, teste “triple antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assay” (TAS-ELISA), com anti-corpos policlonais e monoclonais específicos para *Yam mosaic virus* (YMV), obtidos do IITA, Nigéria e reação de PCR (“polimerase chain reaction”) com oligonucleotídeos degenerados para

detecção de badnavírus e duplex reverse transcription (RT)-PCR com oligonucleotídeos específicos para YMV e *Yam mild mosaic virus* (YMMV). Os produtos de PCR e RT-PCR foram purificados e seqüenciados para validação dos testes usados na detecção de badnavírus e identificação dos potyvírus, por análise comparativa com as seqüências disponíveis no GenBank. Ficou comprovada a ocorrência de pinta preta, causada por *Curvularia eragrostidis* em todas as áreas estudadas, com maior intensidade na cv. Inhame-da-Costa do complexo *D. cayennensis-D. rotundata*, enquanto que o ataque de lagarta das folhas (*Pseudoplusia oo*), presente em todos os campos, teve maior severidade na cv. São Tomé de *D. alata*. As túberas-semente de ambas as espécies de inhame, coletadas em cinco propriedades representativas das áreas de cultivo em Pernambuco e Paraíba, após 60 dias de armazenamento, apresentaram sérios problemas de Podridão Verde, causada por *Penicillium sclerotigenum*, cochonilhas (*Planococcus* sp.) e brocas das túberas (*Araecerus fasciculatus*). Foram identificados os potyvírus YMV e YMMV, ocorrendo em infecção simples e mista com badnavírus, constituindo-se o primeiro registro detalhado com informações moleculares destes vírus no Brasil.

ABSTRACT

The yam (*Dioscorea* spp.) is affected by several diseases and pests occurring in field and/or during transport and storage. It is a crop with a high social economic importance in Northeast of Brazil, showing a good expansion potential by tuber export, especially to Europe. An evaluation of disease and pest development in important producing areas was undertaken, as well as a study on the quality of tuber seed used by the growers. Visits to seven counties of Pernambuco and three of Paraíba, totaling 30 farms were done. In order to evaluate the occurrence of diseases and the damages caused by pests under field conditions, in each field five lines of 10 plants were marked, while for virus evaluation, 30 plants were randomly selected. The plants were analyzed 30 days before and at the harvest day. The nematodes were extracted by association the Jenkins method and identified by their structures under light microscope. For fungus identification, isolation and inoculation were done and the structures were observed under light microscope. For the viruses, observation under electron microscopy, triple antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assay" (TAS-ELISA), with polyclonal and monoclonal antibodies specific to *Yam mosaic virus* (YMV), from IITA, Nigeria, and a polymerase chain reaction (PCR) with degenerated primers for detecting badnavirus and duplex reverse transcription (RT-PCR) with specific primers to YMV and *Yam mild mosaic virus* (YMMV) were used. The PCR and RT-PCR products were purified and sequenced in order to validate the tests used for detecting badnavirus and

identification of the potyviruses by the comparative analyses of the sequences available in the GenBank. It was observed the leaf spot caused by *Curvularia eragrostidis* in all areas studied, with a higher intensity on cv. Inhame-da-Costa of *D. cayennensis*-*D. rotundata* complex, whereas the damages caused by leaf worm (*Pseudoplusia oo*), present in all fields, were higher on cv. São Tomé of *D. alata* plants. The seed tubers of both yam species, collected in five farms representative of the growing areas of Pernambuco and Paraíba, after 60 days of storage, presented serious problems of green rot caused by *Penicillium sclerotigenum*, mealybugs (*Planococcus* sp.) and tuber worms (*Araecerus fasciculatus*). It was identified the potyviruses YMV and YMMV, occurring in single and mixed infections with badnavirus, consisting the first detailed report with molecular information on these viruses in Brazil.

CAPÍTULO I

Introdução Geral

INTRODUÇÃO GERAL

Aspectos gerais da cultura do inhame

O inhame (*Dioscorea* spp.) é uma monocotiledônea, herbácea, pertencente à família Dioscoreaceae, cujo órgão de reserva é conhecido como túbera comercial ou simplesmente túbera. O gênero *Dioscorea* possui cerca de 600 espécies originárias da África, Ásia ou América do Sul (COURSEY, 1976; SANTOS, 1996).

As espécies *D. cayennensis* Lam. e *D. rotundata* Poir., internacionalmente conhecidas como inhame amarelo (“yellow yam”) e inhame branco (“white yam”), originaram-se no continente africano (COURSEY, 1976; AMUSA et al., 2000). Estas duas espécies têm sido reunidas num complexo denominado *D. cayennensis* - *D. rotundata* (MALAURIE et al., 1998). O Inhame-da-Costa ou Cará-da-Costa, cultivar mais utilizada no Brasil, apresenta as características do inhame branco e pertence a este complexo, sendo referido como uma cv. de *D. cayennensis* (SILVA, 1971; SANTOS, 1996; MOURA, 2005) ou de *D. rotundata* (PIO-RIBEIRO et al., 2005; 2006).

Entre as espécies mais cultivadas que tiveram origem no continente asiático, destaca-se *D. alata* L. (AMUSA et al., 2000; MENEZES, 2002), referida como inhame-água (“water yam”), representada no Nordeste do Brasil pela cv. São Tomé (SANTOS, 1996).

Antes da introdução de outras culturas alimentares fornecedoras de raízes, o inhame era a principal fonte de carboidratos para os povos da África Ocidental e Central (OZEROL; MASSEY, 1984; CARMO, 2002;). Atualmente, os maiores produtores de inhame são países tropicais da África Ocidental, principalmente Nigéria e Costa do Marfim, onde se concentram 91% do total que é produzido no mundo, 39.897.327 t/ano, com uma área plantada de 4.438.362 ha. A Nigéria, sozinha, assume 70% do que se produz mundialmente, acima de 26 milhões t/ano, com uma produtividade média de 19.553 kg/ha. Entretanto, países como o Japão, que dispõe de maior nível tecnológico, chegam a alcançar uma produtividade superior a 22.000 kg/ha (FAO, 2005).

Além de alimento humano, o gênero *Dioscorea* apresenta espécies que fornecem produtos de uso farmacológico e industrial, a exemplo de contraceptivos orais e cosméticos (PEIXOTO NETO et al., 2000; MENDES, 2005; MOURA, 2005). O inhame medicinal *D. floribunda* Mart. et Gal. é uma fonte importante de diosgenina, empregada na síntese da cortisona, e em outros compostos de corticosteróides úteis para tratamento alergênicos (CARMO, 2002; MOURA, 2005). As propriedades de algumas espécies de *Dioscorea* são valiosas pela produção de tanino, substâncias anti-alérgicas, sapogeninas esteroidais e alcalóides (COURSEY, 1976; PEDRALLI, 2003).

A produção mundial dessa cultura aumentou em torno de 40% entre 1961 a 1999 (FAO, 2005), o que provavelmente se deu devido a agroindústria farmacêutica que se tornou um campo do agronegócio do

inhame, considerado bastante amplo que envolve a extração e uso dos derivados da diosgenina (PEDRALLI, 2003).

O Brasil produz cerca de 230.000t de inhame anualmente com área plantada de 25.000ha, ficando em segundo lugar em volume produzido na América do Sul, ultrapassado apenas pela Colômbia com 255.000t/ano (FAO, 2005). Por não ser incluída no rol das culturas nobres, a exploração do inhame não é contemplada nas políticas agrícolas importantes, apresentando carência de apoio técnico e de crédito, normalmente destinados às monoculturas de produtos exportáveis (PEIXOTO NETO et al., 2000; RITZINGER et al., 2003).

Apesar de ser referida no cardápio de diversas civilizações ao longo dos séculos e estar presente desde o início da colonização brasileira são os nordestinos quem, praticamente, assumem a demanda do inhame no Brasil. Dessa forma, a região Nordeste apresenta-se como a maior produtora, destacando-se os Estados de Alagoas, Bahia, Pernambuco e Paraíba onde o inhame é normalmente cultivado, utilizando-se mão de obra familiar e baixos níveis tecnológicos, que não tem permitido alcançar produtividade satisfatória (SANTOS, 1996; MOURA, 2002; MENDES, 2005). Em muitos casos, os produtores não dispõem de capital suficiente para aquisição de terras férteis e utilizam equipamentos e maquinários obsoletos. As novas tecnologias que poderiam ser adotadas por produtores com este perfil apresentam dificuldades na sua implementação, desde o alto custo, até o fato dos possíveis usuários serem destituídos de formação e educação

tecnológica. Assim, usam seus próprios conhecimentos e não as práticas e técnicas resultantes de pesquisa e novos conhecimentos provados pela ciência (RITZINGER et al., 2003; SANTOS; MACÊDO, 2006).

Embora seja considerada, na maioria dos casos, uma cultura de subsistência, o inhame tem grande importância sócio-econômica no cenário da agricultura familiar no Nordeste do Brasil, com um significativo potencial de desenvolvimento, contribuindo para alimentação humana, beneficiando populações carentes, além de ser fonte de renda para pequenos e médios produtores (MENDES, 2005; SANTOS; MACÊDO, 2006). O destino da produção varia de acordo com a qualidade do produto e da época do ano, podendo abastecer vários estados do Nordeste e de outras regiões, ou ainda, seguir a rota da exportação. Da produção brasileira de inhame 4.000t/ano, são exportadas, enquanto que outros países sul-americanos destinam sua produção inteiramente ao mercado interno (FAO, 2005). Dessa forma, esta cultura se destaca pelo seu alto valor comercial, com forte potencial no agronegócio de exportação para Europa, especialmente, França e Inglaterra e para os Estados Unidos (RITZINGER et al., 2003; SANTOS; MACÊDO, 2006). A maior dificuldade para comercialização do inhame no exterior, basicamente está no material de baixa qualidade sanitária e colheita precoce, resultando em produto inaceitável para tal demanda (PEIXOTO NETO et al., 2000; MENDES, 2005).

Em Pernambuco, as principais áreas cultivadas encontram-se no Litoral e Zonas da Mata Norte e Sul, tendo os municípios de Aliança,

Condado, Goiana, Igarassu, Itapissuma, Itambé, Barra de Guabiraba, Bonito, Sairé e São Joaquim do Monte, os responsáveis pela maior parte da produção (VEIGA; MOURA; SENA 1970; CEAGESPE, 2002), e de onde se verifica maior fluxo de exportação, tanto para outros Estados como para outros países (MELO, 1994; SANTOS; MACÊDO, 2006).

Doenças do inhame

Dentre os entraves 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, reduzindo a produção e a qualidade do produto em pós-colheita, agravadas por condições de armazenamento e transporte inadequadas (MOURA; TEXEIRA, 1980; MOURA, 2002; RITZINGER et al., 2003).

Entre as doenças, destacam-se as causadas por nematóides, fungos e vírus (RITZINGER et al., 2003; SANTOS; MACÊDO, 2006). Sendo uma cultura propagada vegetativamente, através de túberas sementes, vários agentes fitopatogênicos sobrevivem e se disseminam por esta via, sendo comum o acúmulo de patógenos em anos sucessivos (MOURA; COÊLHO; PIO-RIBEIRO, 1978; MENEZES, 2002).

No campo, os fungos que infectam o inhame, mais prevalentes em nível mundial são *Curvularia eragrostidis* (P. Henn) Mayer e *Colletotrichum* sp. que causam a Queima e Antracnose, respectivamente, doenças da parte aérea da planta, inicialmente com sintomas na forma de manchas

necróticas nas folhas. Com o desenvolvimento, a necrose atinge grande parte ou toda a folhagem e ramos novos (MENEZES, 2002).

A podridão verde, causada por *Penicillium sclerotigenum* Yam., é outra doença importante de natureza fúngica, a qual ocorre em túberas colhidas especialmente, naquelas que sofreram ferimentos durante a colheita e transporte e/ou apresenta danos causados por nematóides (MENEZES, 2002; MOURA, 2002; RITZINGER et al., 2003; MOURA; OLIVEIRA; TORRES, 2006; SANTOS; MACÊDO, 2006).

A doença conhecida como casca preta ou casca seca apresenta grande importância econômica na região Nordeste (MOURA, 2002; 2005). Os sintomas se manifestam no campo e continuam a se desenvolver durante o armazenamento, sendo levado em consideração na classificação das túberas comerciais, constituindo-se um dos principais fatores responsáveis pela queda da qualidade. Esta doença é causada por duas espécies de nematóides. A primeira registrada no Brasil foi *Scutellonema bradys* (Stainer e LeHew), Andrassy (MOURA; COELHO; PIO-RIBEIRO 1978; MOURA; TEIXEIRA, 1980), que tem sido observada na maior parte do mundo onde se cultiva o inhame (MOURA, 2005; RITZINGER et al., 2003). A segunda, *Pratylenchus coffeae* (Zimmermann) (Filipjev & Stekhoven), atualmente é a mais frequentemente encontrada em campos de cultivos comerciais na Região Nordeste do Brasil (MOURA, 2002).

Outras espécies de nematóides infectam o inhame tais como, *Meloidogine incognita* (Kofoid & White) Chitwood; *M. javanica* (Treub.)

Chitwood e *M. arenaria* (Neal) Chitwood, sendo as duas primeiras de maior predominância em cultivos comerciais de Inhame-da-Costa no Nordeste brasileiro (MOURA, 2002; RITZINGER et al., 2003). Segundo Moura, (2005), em *D. alata* não há registro de infecção por nematóide no Nordeste. Contudo, recentemente foi detectada a ocorrência de *S. bradys* nessa espécie no Estado de São Paulo (MOURA; OLIVEIRA; TORRES 2006).

Diversas viroses têm sido descritas na cultura do inhame causadas por membros dos gêneros *Potyvirus*, *Badnavirus*, *Cucumovirus* e *Potexvirus*. Destacam-se pela importância e distribuição geográfica, os potyvírus e badnavírus, ocorrendo em infecções simples e mistas (MUNFORD; SEAL, 1997; PHILLIPS; BRUNT; HULL 1999; YANG et al., 2003; ODU et al., 2006).

Através da análise de seqüências de aminoácidos de seis isolados do *Yam mosaic virus* (YMV), Duterme et al. (1996) confirmaram este vírus como membro do gênero *Potyvirus*. Em estudo realizado com o YMV (Isolado Ivory Coast) foi verificado que o RNA genômico possui 9.608 nucleotídeos (nt) e contém uma “open reading frame” (ORF) que codifica para uma poliproteína de 3.103 aminoácidos. A região 5' do YMV que precede a ORF é de 134 nt enquanto que a região 3' não traduzida (UTR) possui 165 nt excluindo a poli A (ALEMAN et al., 1996; DUTERME et al., 1996).

Um outro potyvírus, *Yam mild mosaic virus* (YMMV), foi encontrado amplamente difundido em países da África Ocidental (MUNFORD; SEAL,

1997). Em nível mundial, as viroses causadas pelas espécies do gênero *Potyvirus* têm acarretado importantes perdas econômicas na cultura do inhame (MALAURIE et al., 1998).

A presença de badnavírus em *Dioscorea* spp. tem sido detectada por Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET), teste sorológico e molecular. Embora se saiba que pelo menos duas espécies virais deste gênero infectam o inhame, há ainda necessidade de desenvolvimento de testes que permitam identificar os isolados ao nível de espécie, em trabalhos de rotina, uma vez que somente com seqüenciamento de todo o genoma viral tem sido possível distingui-las (SEAL; MULLER, 2007)

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 relato foi feito por Ávila et al., (1982), os quais detectaram a presença de um potyvírus na coleção de germoplasma no Estado da Bahia, o que não foi caracterizado por apresentar dificuldades na transmissão mecânica e por insetos, tendo sido observadas, por microscopia eletrônica, partículas e inclusões típicas de potyvírus. Recentemente, trabalhos apresentados em Congressos de Fitopatologia, relatam à identificação das espécies YMV e YMMV de potyvírus e a detecção de badnavírus em inhame na região Nordeste, ocorrendo em campos comerciais (BOARI et al., 2005; ANDRADE et al., 2006; PIO-RIBEIRO, et al., 2005; 2006).

Pragas do inhame

As pragas mais comumente encontradas na cultura do inhame são: lagartas da folhagem, brocas do caule e da túbera e cochonilhas, sendo que as duas últimas pragas ocorrem no armazenamento (RITZINGER et al., 2003; SANTOS; MACÊDO, 2006).

A lagarta da folhagem (*Pseudoplusia oo* Cramer) pertencente à ordem Lepidóptera, família Noctuidae, considerada principal praga do inhame. Esse inseto apresenta coloração verde-claro, medindo de 25 a 35mm de comprimento e possui uma linha clara, branco-amarelada em toda a extensão lateral-mediana do corpo. Os cortes irregulares e arredondados entre as nervuras do limbo foliar e pelo acúmulo de excrementos de cor negra, em forma de bolotas sobre as folhas, danos ocasionados na planta, demonstram a presença do inseto (RITZINGER et al., 2003). O adulto é uma mariposa de hábito noturno, de cor marrom pardacenta, com duas manchas brancas e brilhantes, de formas irregulares e arredondadas, em cada asa anterior (VEIGA; MOURA; SENA, 1970; RITZINGER et al., 2003). As fêmeas depositam os ovos sobre as folhas, as quais servem como alimento durante o desenvolvimento das lagartas, produzindo orifícios irregulares, cortes e rendilhamento no limbo foliar, provocando sérios prejuízos à cultura. O aparecimento das lagartas em campos de inhame está relacionado ao período de chuvas, ocorrendo tanto nos cultivos não irrigados como nos campos com irrigação por aspersão. O ataque dessa praga causa redução do limbo foliar, alterando a fotossíntese, e

consequentemente menor desenvolvimento das túberas e baixa produtividade (GARRIDO; JESUS; SOARES, 2003; RITZINGER et al., 2003).

Outra praga que ataca o inhame é a broca do caule *Xystus arnoldi* (Kirby), que teve a primeira constatação na cultura no Estado da Paraíba e a broca da túbera, *Araecerus fasciculatus* (Degeer) (EMEHUTE; ECHENDU, 1992) sendo esta última praga de armazenamento. A ocorrência dessas pragas nos cultivos conduzidos na mesorregião da Mata Paraibana, zona produtora dessa dioscoreacea não é muito comum (SANTOS, 2006). O adulto da broca do caule é um pequeno besouro de coloração preto brilhante com aproximadamente 4mm de comprimento e 3,5mm de largura. Os machos apresentam um par de espinhos prosternais, recurvados e pontiagudos e uma profunda cavidade de 0,5mm de diâmetro entre as duas patas anteriores. A larva da broca é de cor branco-leitosa, com cabeça escura e apresentando fortes mandíbulas bem desenvolvidas (PEIXOTO NETO et. al., 2000; SANTOS, 2006). Quando ocorre o ataque dessa praga, observa-se o secamento progressivo do ramo principal acima do colo, comprometendo o crescimento e acarretando a morte da planta (SANTOS, 2006).

Identificação de pragas do inhame e diagnose de doenças

A identificação de pragas, de forma geral, é realizada a partir da coleta de insetos e ácaros com uso de armadilhas, seguindo-se da

montagem indicada na literatura para família ou ordem. A avaliação inicial é realizada utilizando-se descrições já existentes e efetuando-se comparações com exemplares depositados em coleções entomológicas que pertençam a instituições confiáveis sem dispensar o uso das chaves de identificação referidas para a ordem da praga encontrada (GALLO et al., 2002).

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 a baixo custo, o que geralmente não acontece na prática, uma vez que, a rapidez e precisão dos testes, geralmente, são inversamente proporcionais ao seu custo (ZERBINI; CARVALHO; ZAMBOLIM, 2002).

Para identificação de fungos, bactérias, fitoplasmas e nematóides os métodos clássicos são importantes, sem descartar as ferramentas modernas, especialmente àquelas advindas com a Biologia Molecular. Em trabalhos de rotina, as observações dos sintomas e sinais são suficientes para uma diagnose segura de muitas doenças, especialmente as causadas por fungos e nematóides, embora o isolamento e inoculação em hospedeiros susceptíveis sejam necessários em determinados casos, fazendo com que a diagnose leve dias ou semanas para ser efetuada (SOUTO; TESSMAN; NUNES, 2000). Muitas vezes, preferem-se testes como os sorológicos e moleculares que proporcionam, em geral, respostas rápidas (04 a 24 horas) e precisas, apesar dos custos bem mais elevados.

Estes são especialmente indicados para os casos de fitobacterioses e fitovirose em trabalhos de rotina e, em especial, quando se trata de espécie nova ou pouco conhecida, para se fazer uma identificação de forma segura e, se necessário, adoção de uma nova nomenclatura (SOUTO; TESSMAN; NUNES, 2000; ZERBINI; CARVALHO; ZAMBOLIM, 2002).

Os testes mais comumente empregados para a diagnose das fitovirose 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 capsidial do vírus; c) testes moleculares, os quais 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).

Com o desenvolvimento da Biologia Molecular, várias técnicas foram evidenciadas como ferramenta auxiliar para identificação de fitopatógenos, o que elevou consideravelmente a eficiência e segurança principalmente no que diz respeito à taxonomia e classificação (ZERBINI; CARVALHO; ZAMBOLIM, 2002). Por meio dos estudos moleculares é possível detectar indivíduos e suas diferenças que muitas vezes são causadas por alterações de um único par de bases, tendo aplicações imediatas na identificação e caracterização de linhagens e genótipos (SOUTO; TESSMAN; NUNES, 2000).

Em inhame, a visualização dos sinais do patógeno, constituídos por partículas e inclusões virais, efetuada através da observação ao MET, é considerada uma ferramenta importante, especialmente, quando não se dispõe de anti-soros ou “primers” específicos para realização de testes sorológicos e PCR (“Polymerase Chain Reaction”), respectivamente. Com a diagnose efetuada apenas com a visualização das partículas e/ou inclusões virais, se pode chegar ao conhecimento do gênero a que pertence o isolado em estudo, uma vez que todas as espécies pertencentes a um determinado gênero possuem a mesma morfologia (ZERBINI; CARVALHO; ZAMBOLIM, 2002). Análise ao MET também tem sido usada, para indexação de material de micropropagação quando se quer confirmar a ausência de vírus (LAWSON et al., 1973; WATERWORTH; LAWSON; KAHN, 1974).

A análise de gama de hospedeiros é um método biológico que consiste na inoculação do isolado viral em plantas de uma série de espécies ou variedades botânicas ou cultivares, ditas indicadoras, e observação das reações de cada uma delas. A diagnose é realizada comparando os sintomas observados com àqueles relatados na literatura (ZERBINI; CARVALHO; ZAMBOLIM, 2002). Em inhame, apesar de ter sido usado em vários trabalhos, este método não têm mostrado resultados satisfatórios devido às dificuldades apresentadas pelos vírus que infectam esta cultura em serem transmitidos experimentalmente, seja por inoculação mecânica, seja com uso de vetores (PIO-RIBEIRO et al., 2006).

O método sorológico “enzyme-linked immunosorbent assay” (ELISA) é um teste de imunoabsorção que emprega uma enzima ligada ao anticorpo, a qual confere maior sensibilidade, pela reação com o substrato nas amostras em que ocorre a reação sorológica. Este teste é capaz de identificar cerca de 100pg de antígeno em uma amostra, enquanto a dupla difusão em ágar exige mais que 2 µg de antígeno para a detecção (ALMEIDA, 2001; ZERBINI; CARVALHO; ZAMBOLIM, 2002). Em inhame, o uso do teste ELISA para detectar e identificar vírus tem diminuído, pela dificuldade de obtenção de anti-soros específicos de boa qualidade.

Através das técnicas de PCR e RT-PCR, que consistem na amplificação de seqüências DNA e cDNA, respectivamente, se atinge uma grande seletividade, sensibilidade e rapidez adequadas para detecção e identificação de fitovírus (SOUTO; TESSMAN; NUNES, 2000; ZERBINI; CARVALHO; ZAMBOLIM, 2002). Por outro lado, o sequenciamento do produto da PCR ou da RT-PCR permite a validação da técnica como método de diagnose, o que pode ser também obtido com hibridização de ácido nucléico, usando-se sondas quentes ou frias (MOWAT; DAWSON, 1987; ZERBINI; CARVALHO; ZAMBOLIM, 2002). Na cultura do inhame, PCR e RT-PCR têm sido as técnicas preferidas para identificação dos vírus e diagnose das fitoviroses (MUNFORD; SEAL, 1997; YANG et al., 2003; ANDRADE et al., 2006; PIO-RIBEIRO et al., 2006).

O presente trabalho teve como objetivo elaborar um diagnóstico dos problemas fitossanitários de áreas produtoras de inhame em Pernambuco e Paraíba e caracterizar isolados virais obtidos desses Estados e da Bahia.

REFERÊNCIAS

ALEMAN, M. E.; MARCOS, J. F.; BRUGIDOU, C.; BEACHY, R. N.; FAUQUET, C. et al. The complete nucleotide sequence of Yam mosaic virus (Ivory Coast isolate) genomic RNA. **Archives of Virology**, New York, v. 141, n. 7, p. 1259-1278, 1996.

ALMEIDA, A. M. R. Detecção e quantificação de vírus por ELISA. In: ALMEIDA, A. M. R.; LIMA, J. A. A. (Eds.) **Princípios e técnicas de diagnose aplicadas em fitovirologia**, Brasília, DF, 2001. p. 63-94.

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, 2000.

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).

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.

BOARI, A. J.; AZEVEDO, V. G.; SILVA-MANN, R.; FRANCO-FILHO, E.; KITAJIMA, E. W. Ocorrência de *Badnavirus* e *Potyvirus* em inhame (*Dioscorea* sp.) no estado de Sergipe. **Summa Phytopathologica**, Jaguariuna, SP, v. 31, p. 35-36, 2005. (Resumo).

CARMO, C. A. S. Situação das culturas do taro e do Inhame no Estado do Espírito Santo. Vitória, ES: **INCAPER**, 2002. 7p.

COMPANHIA DE ENTREPÓSITOS E ARMAZÉNS GERAIS DE PERNAMBUCO – CEAGESPE. **Inhame**. Pernambuco: CEAGESPE, 2002. 2 p.

COURSEY, D. G. Yams - *Dioscorea* spp. (Dioscoreaceas). In: SIMMONDS, N. W. **Evolution of crop plants**, New York, Ed. Longman, 1976. p. 70-74.

DUTERME, O.; COLINET, D.; KUMMERT, J.; LEPOIVRE, P. Determination of the taxonomic position and characterization of Yam mosaic virus isolates based on sequence data of the 5-terminal part of the coat protein cistron. **Archives of Virology**, New York, v. 141, n. 6, p. 1067-1075, 1996.

EMEHUTE, J. K. U.; ECHENDU, N. T. C. Susceptibility of stored yam tubers (*Dioscorea* spp.) To infestation by *Araecerus fasciculatus* Degeer. **Tropical Science**, London, v. 32, n. 1, p. 99-103, 1992.

FAO. FAOSTAT – Agricultural statistic database. Roma. World Agricultural Information Center, 2005. Disponível em:

<http://faostat.fao.org/faostat/form?collection=Production.Crops.Primary&Domain=Production&servlet=1&hasbulk=0&version=ext&language=EN> Acesso em : 07/02/06.

GALLO, D.; NAKANO, O.; NETO, S. S.; CARVALHO, R. P. L; BAPTISTA, G. C.; FILHO, E. B.; PARRA, J. R. P. ZUCCHI, R.A. Coleta, montagem e conservação de insetos, In: GALLO, D. **Entomologia Agrícola**, São Paulo, SP, v. 10, p. 182-189, 2002.

LAWSON, R. H.; HEARON, S. S.; SMITH, F. F.; KAHN, R. P. Electron microscopy and separation of viruses in *Dioscorea floribunda*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 63, p. 1435, 1973. (Abstract).

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. **EJB Eletronic Journal of biotechnology**, London, v. 1, n. 3, p. 1-15 1998.

MELO, N. F. **Cultivo *in vitro* de Cará-da-Costa (*Dioscorea cayennensis* Lam.) – aspectos e condições adequadas**. Recife: UFRPE, 1994. 85p. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal Rural de Pernambuco.

MENDES, R. A. Cultivando inhame ou Cará da Costa. Cruz das Almas: EMBRAPA, 26p. 2005. **(Circular Técnica, n. 4)**.

MENEZES, M. Condições epidemiológicas de doenças fúngicas na cultura do inhame. In: **SIMPÓSIO NACIONAL SOBRE AS CULTURAS DO INHAME E DO TARO**, 2., 2002, João Pessoa. **Anais ...** UFPB, 2002.

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, 2005, p. 415-419.

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

MOURA, R. M.; TEIXEIRA, L. M. S. Aspectos morfológicos de *Scutellonema bradys* (Steiner & Leheew, 1933) Andrassy, 1958 (*Nematoda hoplolaiminae*). **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, DF, v. 5, p. 359-367, 1980.

MOURA, R. M.; COELHO, R. S. B.; PIO-RIBEIRO, G. Estudo etiológico e efeito de 1,2,-dibromo-3-cloropropano no controle da casca preta do inhame

(*Dioscorea cayennensis* Lam.) para plantio. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, DF, v. 3, p. 47-53, 1978.

MOURA, R. M.; OLIVEIRA, I. S.; TORRES, G. R. C. Primeiro assinalamento de *Scutellonema bradys* em *Dioscorea alata* no Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, DF, v. 31, p. 506, 2006. (Resumo).

MOWAT, W. P.; DAWSON, S. Detection of plant virus by ELISA using crude sap unfractionated antisera. **Journal Virology Methods**, Amsterdam, v. 15, p. 233-247, 1987.

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

OZEROL, N. H.; MASSEY, H. F. Specilization in the understanding of production the root tropical potatos, yam and cocoyams. **Root Crop**, Austrália, v. 15, p. 1-23, 1984.

PEDRALLI, G. *Dioscoreaceae* e *Araceae*: aspectos taxonômicos, etnobotânicos e espécies nativas com potencial para melhoramento genético. **Revista Agropecuária**, p. 1-7, 2003.

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, R. W.; BRUNT, A. A.; HULL R. The partial characterization of a Badnavirus infecting the greater Asiatic or Water yam (*Dioscorea alata*). **Journal of Phytopathology**, Berlim, v. 147, p. 434-439, 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**, Brasília, v. 31, p. S. 309, 2006. (Resumo).

PIO-RIBEIRO, G.; MELO-FILHO, P. A.; KITAJIMA, E. W.; LIMA, S. K.; ANDRADE, G. P.; DOMINGOS, C. A. Detecção de potyvírus em inhame em áreas produtoras de Pernambuco e obtenção de matrizes *in vitro*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, DF, v. 30, p. S 183, 2005. (Resumo).

RITZINGER, C. H. S. P.; SANTOS FILHO, H. P.; ABREU, K. C. L. M.; FANCELLI, M.; RITZINGER, R. Aspectos fitossanitários da cultura do inhame. 2003, 39p. (**Documentos EMBRAPA/SPI**).

SANTOS, E. S. **Inhame (*Dioscorea spp.*)**: aspectos básicos da cultura. João Pessoa: EMEPA-PB, SEBRAE, 1996. 158p.

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: 15 dez. 2006.

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](http://www.emepa.org.br/php) Acesso em: 15 dez. 2006.

SEAL, S.; MULLER, E. Molecular analysis of a full-length sequence of a new yam badnavirus from *Dioscorea sasibarensis*. **Archives of Virology**, New York, v. 152, n. 4, p. 819-825, 2007

SILVA, A. A. A cultura do cará-da-Costa. Fortaleza, CE, 1971. 66p. (**Boletim Técnico**).

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.

VEIGA, A. F. S. L.; MOURA, R. M.; SENA, R. C. **Aspectos fitossanitários do cará inhame: variedade da Costa (*Dioscorea cayennensis* Lam.) no Nordeste do Brasil**. Secretaria de Agricultura de Pernambuco - SAG-PE, 1970, 18p.

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

WATERWORTH, H. E.; LAWSON, R. H.; KAHN, R. P. Purification electron microscopy, and serology of *Dioscorea latent virus*. **Journal Agriculture University Puerto Rico**, v. 58, n. 3, p. 351-357, 1974.

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

CAPÍTULO II

Análise dos principais problemas fitossanitários do inhame em Pernambuco e Paraíba

1 **Análise dos principais problemas fitossanitários do inhame em**
2 **Pernambuco e Paraíba**

3

4 Genira P. de Andrade¹, Myriam A. Khalid², Philippe Vernier², Péricles A.
5 Melo Filho¹, Gilvan Pio-Ribeiro¹, Elvira M. R. Pedrosa¹, Delson Laranjeira¹,
6 André S. Xavier¹

7 ¹UFRPE, Departamento Agronomia, Recife-PE, CEP. 52171-900; ²CIRAD,
8 Montpellier, França.

9 Autor para correspondência: Genira Pereira de Andrade

10

11 Recebido para publicação em / / ; aceito em / /

12

13

14

15

RESUMO

16

17 Visando avaliar a qualidade do material de propagação de inhame
18 (*Dioscorea* spp.) utilizado nos Estados de Pernambuco e Paraíba e a
19 ocorrência de doenças e pragas, foram realizadas visitas a 30 propriedades
20 para análise de 80 plantas em cada uma, um mês antes e no período da
21 colheita. Para a identificação dos fitonematóides foram observadas as
22 estruturas de espécimes extraídas com a coleta de 10g de casca, utilizando-
23 se a associação da técnica da maceração rápida em liquidificador, flotação
24 centrífuga com o método de Jenkins. Para os fungos, isolamento e
25 observação das estruturas e, para os vírus, os testes “triple antibodies
26 sandwich enzyme-linked immunosorbent assay” (TAS-ELISA), com
27 anticorpos policlonais e monoclonais específicos para *Yam mosaic virus*,
28 “polimerase chain reaction” (PCR) com oligonucleotídeos degenerados para
29 detecção de badnavírus e duplex “reverse transcription PCR” (RT-PCR),
30 com oligonucleotídeos específicos para YMV e *Yam mild mosaic virus*
31 (YMMV). A pinta preta (*Curvularia eragrostidis*) e a lagarta da folha
32 (*Pseudoplusia* oo) foram detectadas em todas as áreas de cultivo com maior
33 freqüência na cv. Inhame-da-Costa do complexo *D. cayennensis*-*D.*
34 *rotundata* e *D. alata*, respectivamente. Em ambas as espécies de inhame,

35 observaram-se *Meloidogyne* spp. e os agentes da casca preta *Pratylenchus*
36 *coffea* (espécie prevalente) e *Scutellonema bradys*. Foi detectado
37 badnavírus em infecção simples e mista com YMV and YMMV. Em túberas-
38 semente detectou-se a podridão verde (*Penicillium sclerotigenum*) em 80 e
39 60% das propriedades na cv. Inhame-da-Costa e na cv. São Tomé,
40 respectivamente. Notificou-se também a broca das túberas (*Araecerus*
41 *fasciculatus*) e cochonilhas (*Planococcus* sp.) em material de propagação
42 armazenado oriundos das áreas estudadas.

43

44 Palavras-chave adicionais: *Dioscorea*, *Yam mosaic virus*, *Yam mild mosaic*
45 *virus*, badnavírus, potyvírus

46

ABSTRACT

47

48 In order to evaluate the quality of the propagative material of yam
49 (*Dioscorea* spp.) used in the states of Pernambuco and Paraíba and the
50 development of diseases and pests, 30 farms were visited to analyse in each
51 one plants the insect damages and the diseases of the aerial part on 80, a
52 month before and at the harvest day. For nematode identification the
53 structures of specimens extracted by the Jenkins methods were observed;
54 for the fungi, isolation and structure observation and, for the viruses, the
55 tests triple antibodies sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (TAS-
56 ELISA), with polyclonal and monoclonal antibodies specific for *Yam mosaic*
57 *virus*, polymerase chain reaction (PCR) with degenerated primers for
58 detecting badnavirus and duplex reverse transcription PCR (RT-PCR), with
59 primers specific for YMV e *Yam mild mosaic virus* (YMMV) were used. Leaf
60 spot (*Curvularia eragrostidis*) and leaf worm (*Pseudoplusia* oo) were
61 detected in all growing areas, with higher frequency on cv. Inhame-da-Costa

62 of *D. cayennensis*-*D. rotundata* complex and cv. São Tomé of *D. alata*,
63 respectively. In both yam species it was observed *Meloidogyne* spp. and the
64 agents of dry rot *Pratylenchus coffea* (prevalent specie) and *Scutellonema*
65 *bradys*. It was detected badnavirus in single and mixed infections with YMV
66 and YMMV. In seed tubers it was detected the green rot (*Penicillium*
67 *sclerotigenum*) in 80 and 60% of the farms on cv. Inhame-da-Costa and São
68 Tomé, respectively. It was registered the tuber worm (*Araecerus*
69 *fasciculatus*) and the mealy bugs (*Planoccocus* sp.) in stored propagative
70 materials from all studied areas.

71

72 **Additional key words:** *Dioscorea* spp., *Yam mosaic virus*, *Yam mild mosaic*
73 *virus*, badnavírus, potyvírus

74

75

76

INTRODUÇÃO

77 O inhame (*Dioscorea* spp.) é uma planta trepadeira, monocotiledônea
78 da família Dioscoreaceae. Cerca de 600 espécies desse gênero já foram
79 descritas, destacando-se entre elas *D. rotundata* Poir., *D. alata* L., *D.*
80 *cayennensis* Lam., *D. esculenta* (Lour.) Burk. e *D. trifida* L. por produzirem
81 túberas comestíveis (Santos, 1996; Garrido *et al.*, 2003).

82 A cultura do inhame tem grande importância sócio-econômica no
83 Nordeste brasileiro por participar fortemente da base alimentar de
84 populações rurais e urbanas (Mendes, 2005; Santos & Macêdo, 2006),
85 constituindo-se alimento energético, com elevado teor de carboidrato, além

86 de fonte de vitaminas e sais minerais (Santos, 1996; Menezes, 2002;
87 Ritzinger *et al.*, 2003; Mendes, 2005; Santos & Macêdo, 2006).

88 Vários Estados brasileiros produzem inhame, com áreas de cultivo
89 variadas, estando mais concentradas no Nordeste, sendo Pernambuco e
90 Paraíba os maiores produtores (Moura, 2002). Nessa região, a cultivar
91 Inhame-da-Costa, do complexo *D. cayennensis-D. rotundata*, é a mais
92 plantada e a cv. São Tomé de *D. alata* L. é usada para plantio em menor
93 escala, apresentando forte potencial para expansão, por proporcionar
94 elevada rentabilidade. Essas espécies se desenvolvem de forma satisfatória
95 em clima tropical quente e úmido (Garrido *et al.*, 2003; Ritzinger *et al.*, 2003;
96 Moura *et al.*, 2006).

97 O plantio de inhame no Estado de Pernambuco apresenta maior
98 concentração nas regiões Agreste e Zona da Mata, especialmente, nos
99 municípios de Aliança, Bonito, Condado, Goiana, Sairé e São Joaquim do
100 Monte. Na Paraíba, os principais municípios produtores são Alhandra,
101 Conde e Santa Rita, que se localizam na região litorânea (Santos, 1996,
102 2006).

103 No cultivo comercial do inhame o plantio é realizado utilizando-se
104 normalmente túberas-sementes ou segmentos de túberas comerciais
105 (Santos, 1996). Esse método de propagação vegetativa, associado ao baixo
106 nível tecnológico empregado, em geral, favorece a sobrevivência, acúmulo e
107 disseminação de patógenos e pragas que podem ser introduzidas em áreas
108 isentas, via material de propagação (Menezes, 2002; Oliveira *et al.*, 2006).

109 O manejo desta olerícula, da maneira que é conduzido pelos
110 produtores nordestinos, contribui decisivamente para baixa produtividade e

111 qualidade das túberas comerciais. O uso de túberas-semente infectadas
112 compromete os plantios subseqüentes, constituindo-se principal fator
113 limitante para a produção da cultura (Santos, 1996; Peixoto Neto *et al.*,
114 2000; Moura *et al.*, 2006; Oliveira *et al.*, 2006).

115 Durante a fase de desenvolvimento da planta do inhame verifica-se a
116 ocorrência de pragas e vários patógenos de natureza fúngica e viral entre
117 os fungos já relatados em nível mundial encontram-se *Curvularia*
118 *eragrostidis* (P. Henn) Mayer, *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. Sacc.,
119 *Pestalotia* sp. e *Rhizoctonia solani* Kuhn. (Amusa *et al.*, 2000). A lagarta da
120 folhagem (*Pseudoplusia oo*) Cramer, da ordem Lepidóptera, família
121 Noctuidae é considerada a principal praga da cultura. Outra praga que
122 também ataca a planta do inhame é a broca do caule (*Xystus arnoldi* Kirby),
123 que teve a primeira constatação na cultura no Estado da Paraíba (Santos,
124 2006), O adulto da broca do caule é um pequeno besouro de coloração
125 preto brilhante, que provoca o secamento progressivo do ramo principal
126 acima do colo, comprometendo o crescimento da planta, podendo acarretar
127 a morte (Ritzinger *et al.*, 2003).

128 As viroses causadas pelos *Yam mosaic virus* (YMV), um potyvirus de
129 grande importância para o inhame (Aleman *et al.*, 1996) *Yam mild mosaic*
130 *virus* (YMMV), *Dioscorea alata bacilliform virus* (DaBV) (Phillips *et al.*, 1999),
131 *Cucumber mosaic virus* (CMV) que, dependendo das condições da cultura e
132 da espécie viral, pode chegar a ocasionar perdas acima de 40% na
133 produção (Pio-Ribeiro *et al.*, 2005; 2006; Andrade *et al.*, 2006).

134 Dentre as doenças e pragas que causam redução na qualidade das
135 túberas comerciais e túberas-sementes ressaltam-se: a praga de

136 armazenamento, conhecida como broca da túbera *Araecerus fasciculatus*
137 (Degeer) (Emehute & Echendu, 1992); as fitonematoses casca preta,
138 causada por *Scutellonema bradys* (Stainer & LeHew) Andrassy, (Amusa *et*
139 *al.*, 2003) e *Prathylenchus coffeae* (Filipjev & Stekhoven) (Oliveira *et al.*,
140 2006) e a meloidoginose causada por *Meloidogyne* spp.; a podridão verde
141 que tem como agente *Penicillium sclerotigenum* Yam. (Oliveira *et al.*, 2006).

142 A identificação da praga e a diagnose segura da doença em qualquer
143 cultura é de fundamental importância para se determinar as medidas
144 necessárias para se atingir um controle eficaz. Atualmente, as técnicas de
145 diagnose, usando-se métodos moleculares têm sido bastante indicadas,
146 especialmente para as viroses, por proporcionar resultados precisos. No
147 entanto, existem casos em que não se podem dispensar estudos biológicos
148 e métodos clássicos como o uso de microscópio eletrônico para
149 visualização das partículas virais (Souto *et al.*, 2000; Azevedo *et al.*, 2003).

150 O presente trabalho teve como objetivo analisar nos Estados de
151 Pernambuco e Paraíba a qualidade do material propagativo usado pelos
152 produtores de inhame e a ocorrência dos principais agentes de doenças e
153 pragas em áreas de produção comercial e em armazenamento de túberas-
154 sementes.

155

156

MATERIAL E MÉTODOS

157

158 O trabalho foi conduzido em áreas de produção comercial de inhame
159 em Pernambuco e Paraíba e nos Laboratórios de Fitonematologia,
160 Fitovirologia e Fitopatologia Molecular do Departamento de Agronomia da
161 Universidade Federal Rural de Pernambuco e no Núcleo de Apoio a
162 Pesquisa em Microscopia Eletrônica aplicada a Pesquisa Agropecuária
163 NAP/MEPA, ESALQ/USP.

164

165 Para verificação da ocorrência de pragas e patógenos nas áreas
166 produtoras de inhame, 10 municípios foram visitados em Pernambuco e
167 Paraíba, sendo sete no primeiro Estado e três no segundo, perfazendo um
168 total de 30 propriedades, onde foram coletadas amostras foliares e/ou
169 túberas-semente e comerciais. Em cada campo selecionado, foram
170 marcadas 50 plantas, (cinco linhas aleatórias com 10 plantas cada), para
171 analisar ocorrência de pragas, fungos e nematóides fitopatogênicos. Para
172 avaliação de infecção viral, mais 30 plantas foram marcadas, escolhidas
173 aleatoriamente (sendo 10 com sintomas intensos, 10 com poucos sintomas
174 e 10 assintomáticas) (Figura 1 A – E).

174

175 Em relação às pragas, foram avaliados no campo os danos causados
176 pela alimentação de insetos nas folhas do inhame na forma de perfurações
177 e observando-se a presença de lagartas. A ocorrência dos patógenos foi
178 avaliada com base na sintomatologia um mês antes e no período da
179 colheita, quando se registraram, além da presença de manchas foliares, os
180 sintomas causados por nematóide nas túberas na hora da capação.

180 Para análises laboratoriais dos principais patógenos que ocorreram
181 na lavoura e as pragas e os patógenos presentes durante o
182 armazenamento, foram coletadas folhas e túberas-semente e/ou comerciais
183 da cv. São Tomé de *D. alata* e a cv. Inhame-da-Costa do complexo *D.*
184 *cayennensis-D. rotundata* em cinco propriedades: uma de São Joaquim do
185 Monte; uma de Goiana-PE; uma em Condado-PE e duas no município do
186 Conde-PB, representando as principais áreas de produção. Para a pinta
187 preta foram realizados isolamentos a partir de folhas com sintomas,
188 utilizando-se meio BDA. Após sete dias foram realizadas medidas do
189 crescimento radial da colônia fúngica com auxílio de régua milimetrada e
190 preparadas lâminas para observação das estruturas e identificação do
191 patógeno.

192 As túberas foram incubadas em condições de temperatura e umidade
193 iguais às utilizadas pelos produtores da região em estudo, depositadas em
194 bandejas plásticas, previamente forradas com papel jornal e deixadas por
195 60 dias, período normal de armazenamento para quebra da dormência.

196 Após o período de armazenamento, foram realizadas observações
197 visuais nas túberas-semente para avaliar danos de infestação de
198 cochonilhas e perfurações e galerias causadas pela broca das túberas
199 (Santos, 1996; Novo & Baptista, 1998).

200 Após o período de incubação, a presença de *P. sclerotigenum* nas
201 túberas foi determinada com base na observação visual do crescimento
202 fúngico e retiradas amostras presente em cinco túberas-semente, de cada
203 uma das propriedades estudadas, para isolamento e identificação do fungo,
204 usando-se o procedimento descrito para pinta preta. Realizou-se

205 visualização da formação e coloração da colônia em placa de Petri e
206 estrutura em lâmina. Em seguida, foi efetuado teste de patogenicidade
207 realizando inoculação dos isolados, transferindo-se discos de meio BDA
208 com colônia fúngica para segmentos de túberas sadias previamente feridas.
209 De três isolados foram realizadas microculturas para preparação de
210 lâminas, observação ao microscópio e registro fotográfico.

211 Para quantificação dos nematóides nas túberas-semente
212 armazenadas de cada propriedade, amostras de cinco túberas da cv.
213 Inhame-da-Costa e da cv. São Tomé foram processadas pelo método de
214 Jenkins (Jenkins, 1964) com adaptação, sendo a extração foi efetuada com
215 dez gramas de cada túbera trituradas em liquidificador e peneiradas em um
216 conjunto de peneiras de 200 sobre 500 Mesh do tipo “stand” seguida de
217 flotação centrífuga, os quais foram contados ao microscópio ótico.

218 Para análise de vírus foram realizados os seguintes procedimentos:
219 cinco amostras de cada cultivar de inhame com sintomas intensos de
220 mosaico foram utilizadas para preparações do tipo “Leaf dip” e cortes
221 ultrafinos e observação ao Microscópio Eletrônico de Transmissão (MET);
222 teste “Triple antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assay” (TAS-
223 ELISA) com anticorpos policlonais e monoclonais contra YMV, adquiridos no
224 IITA, Nigéria; “Polymerase chain reaction” (PCR) para detecção de
225 badnavírus, no qual se utilizaram oligonucleotídeos degenerados (Yang *et*
226 *al*, 2003) e duplex “reverse transcription PCR” (RT-PCR) para identificação
227 dos potyvírus com oligonucleotídeos específicos para YMV e YMMV
228 (Munford & Seal, 1997). Os isolados usados para análise de seqüência
229 foram denominados usando a sigla do município de origem: Bonito (BON),

230 Itapissuma (ITA), Quipapá (QUI), São Joaquim do Monte (SJM) de
231 Pernambuco; Conde (CND) da Paraíba e Cruz das Almas (CRA) da Bahia.

232 Tanto para PCR como para RT-PCR foi empregado o método
233 cobertura (“Coating”) em substituição ao procedimento clássico de extração
234 de RNA ou captura do vírus com anticorpos. O procedimento de cobertura
235 consiste em maceração do tecido com tampão carbonato, acrescido 1% de
236 PVP e de 2% de sulfito de sódio 1:10 (p/v), seguida de centrifugação a
237 6000g por 5 minutos a 4°C, transferência de alíquota de 25µL para tubos de
238 PCR e incubação por uma noite a 4°C. Finalmente conclui-se o
239 procedimento com duas lavagens com PBS-T esterilizado e uma vez com
240 água Milli-q. Para os potyvírus utilizou-se Kit One Step RT-PCR e para
241 badnavírus a Taq-polymerase em PCR ambos da Invitrogen, seguindo
242 instruções do fabricante.

243

244 **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

245

246 Foi verificada a ocorrência de lagartas causando redução do limbo
247 foliar, alterando a área fotossintética e como consequência resultando em
248 pouco desenvolvimento das túberas e baixa produtividade, conforme
249 descrito em Garrido *et al.* (2003) e Ritzinger *et al.* (2003). Entre as pragas
250 de armazenamento foram detectadas cochonilhas (*Planococcus* sp.) e
251 brocas das túberas (*A. fasciculatus*), comuns em condições quentes e
252 úmidas de armazenamento, locais geralmente usados por produtores da
253 região onde se cultiva inhame (Figura 2 A - E).

254 Foi detectada a presença de *C. eragrostidis* espécie fúngica que
255 infecta parte aérea (Figura 3A) nas três áreas fisiográficas visitadas dos

256 Estados, com maior prevalência em áreas de plantios mais adensados.
257 Estes resultados estão de acordo com os obtidos por Paula *et al.* 2000.

258 A presença de *P. sclerotigenum* nas túberas foi determinada baseada
259 na observação do crescimento fúngico seguindo-se da reinoculação após
260 sete dias, em fragmentos de túberas sadias (Figura 3 B - D).

261 Para a cultivar Inhame-da-Costa foi constatada a presença deste
262 fungo em 80% das propriedades e 60% na cv. São Tomé nas principais
263 áreas produtoras.

264 Com os resultados obtidos nas análises foi constatada a presença de
265 nematóide causando infecção em ambas cultivares em todas as
266 propriedades. As espécies detectadas foram: *Meloidogyne* spp., *S. bradys* e
267 *P. coffeae* em Pernambuco e Paraíba, observando marcante predominância
268 de *P. coffeae*. A esse respeito, Moura *et al.*, 2002 mostram que, atualmente,
269 nas regiões fisiográficas envolvidas no estudo tem ocorrido a substituição da
270 espécie *S. bradys*, comum no inhame, por *P. coffeae* (Figura 4 A - H).

271 Para vírus, os testes TAS-ELISA e de microscopia eletrônica de
272 transmissão (MET) revelaram a presença de YMV em amostras da cv.
273 Inhame-da-Costa, oriundas de QUI, entretanto, não se obteve reação
274 positiva para amostras da cv. São Tomé oriundo de Itapissuma, também
275 município pernambucano.

276 Os resultados obtidos através de análises do material em MET
277 concordam com os dados de estudos de Ávila *et al.* (1982) e Pio-Ribeiro *et*
278 *al.* (2005, 2006), que demonstraram infecção em inhame causada por
279 potyvírus. Boari *et al.* (2005), usando a mesma ferramenta, registraram a
280 ocorrência de potyvírus e badnavírus em inhame.

281 A partir dos testes de PCR e RT-PCR identificou-se a espécie YMV,
282 YMMV e detectou-se badnavírus, nas três regiões estudadas e nas duas
283 cultivares nas áreas de produção comercial dos dois Estados. O
284 sequenciamento para potyvírus dos produtos de RT-PCR dos isolados virais
285 QUI, SJM e CND confirmou a separação de duas espécies distintas deste
286 gênero infectando o inhame e com a obtenção das seqüências parciais para
287 badnavírus foi confirmado que os isolados QUI, CRA e ITA pertencem a
288 mesma espécie. Esses resultados estão de acordo com os obtidos por Yang
289 *et al.* (2003), que estudaram os badnavírus em taro e inhame e Munford &
290 Seal (1997) que sequenciaram YMV e YMMV em inhame (Andrade *et al.*,
291 2006; Pio-Ribeiro *et al.*, 2006).

292

293

LITERATURA CITADA

294 AMUSA, NA; ADEGBITE, AA; MUHAMMED, S; BAIYWU, RA. 2000. Yam
295 diseases and its management in Nigeria. *African Journal of Biotechnology*. 2:
296 (12), 497-502.

297

298 ALEMAN, ME; MARCOS, JF; BRUGIDOU, C; BEACHY, RN.; FAUQUET, C.
299 1996. The complete nucleotide sequence of Yam mosaic vírus (Ivory Coast
300 isolate) genomic RNA. *Archives of Virology* 141: (7), 1259-1278.

301

302 ANDRADE, GP; SILVA, AKS; FILLoux, D; PIO-RIBEIRO, G; KITAJIMA,
303 EW; XAVIER, DM. 2006. Plantas de *Dioscorea alata* infectada com YMMV
304 no estado de Pernambuco. *Fitopatologia Brasileira* 31:..S 344.

305

306 ÁVILA, AC; GAMA, MICS; KITAJIMA, EW. 1982. Detecção de um *Potyvirus*
307 em inhame (*Dioscorea* spp.) no Brasil. *Fitopatologia Brasileira* 7: (1)
308 447-452.

309

310 AZEVEDO, MO; FELIPE, MSS; BRÍGIDO, MM; MARANHÃO, AQ; SOUZA,
311 MT. 2003. *Técnicas básicas em Biologia Molecular*. Brasília-DF: Editora
312 Universidade de Brasília. 212p.

313

314 BOARI, AJ; AZEVEDO, VG; SILVA-MANN, R; FRANCO-FILHO, E;
315 KITAJIMA, EW. 2005. Ocorrência de *Badnavirus* e *Potyvirus* em inhame
316 (*Dioscorea* sp.) no estado de Sergipe. *Summa Phytopathologica* 31: 35-36,

317

318 EMEHUTE, JKU; ECHENDU, NTC. 1992. Susceptibility of stored yam tubers
319 (*Dioscorea* spp.) To infestation by *Araecerus fasciculatus* Degeer, *Tropical*
320 *Science* 32: (1) 99-103.

321

322 GARRIDO, MS; JESUS, ON; SOARES, ACF. 2003. Produção e qualidade
323 de túberas de inhame (*Dioscorea cayennensis* Lam.) em sistema de
324 produção (MSG) fileira dupla. In: *Sociedade Brasileira de Olericultura*, 43
325 S.B.O., CD-ROM.

326

327 JENKINS, WR. 1964. A rapid centrifugal-flotation, technique for separating
328 nematodes from soil. *Plant Disease Reporter* 48: 692.

329

330 LAWSON, RH; HEARON, SS; SMITH, FF; KAHN, RP. 1973. Electron
331 microscopy and separation of viruses in *Dioscorea floribunda*.
332 *Phytopathology* 63: 1435.

333

334 MENDES, RA. 2005. Cultivando inhame ou Cará da Costa. Cruz das Almas.
335 EMBRAPA. *Circular Técnica n. 4*, 26p.

336

337 MENEZES, M. 2002. Condições epidemiológicas de doenças fúngicas na
338 cultura do inhame. In: Santos, ES. (Coord.) *Simpósio Nacional sobre as*
339 *culturas do Inhame e do Taro 2*: 50-67.

340

341 MOURA, RM. 2002. Problemas fitossanitários do inhame no Nordeste e
342 proposta para um sistema integrado de controle. In: Santos, ES. (Coord.)
343 *Simpósio Nacional sobre as culturas do Inhame e do Taro 2*: 50-67.

344

345 MOURA, RM; OLIVEIRA, IS; TORRES, GRC. 2006. Primeiro assinalamento
346 de *Scutelonema bradys* em *Dioscorea alata* no Brasil. *Fitopatologia*
347 *Brasileira* 31: 506.

348

349 MUMFORD, RA; SEAL, SE. 1997. Rapid Single-tube immunocapture RT-
350 PCR for the detection of two yam potyviruses. *Journal of Virological*
351 *Methods* 69: 73-79.

352

353 NOVO, JPS; BAPTISTA, GC. 1998. Resposta do caruncho-do-café
354 *Araecerus fasciculatus* (Deg.) (Coleoptera:Anthribidae) a feromônios. *Revista*
355 *da Sociedade Entomológica do Brasil* 27: (3), p.1-9.

356

357 OLIVEIRA, IS; LUZ, EDMN; BEZERRA, JL; MOUZA, RM; TORRES, GRC;
358 MAIA, LC. 2006. Severidade da podridão-verde em inhames e
359 especialização fisiológica de *Penicillium sclerotigenum*. *Fitopatologia*
360 *Brasileira* 31: 094-098.

361

362 PAULA, H; MICHEREFF, SJ; COSTA, VSO; LARANJEIRA, D; OLIVEIRA,
363 SMA. 2000. Variabilidad de aislamientos de *Curvularia eragrostidis* que
364 causan atizonamiento de las hojas de ñame (*Dioscorea cayennensis*) en
365 Pernambuco, Brasil. *Boletín Micológico* 11: (1) 85-92.

366

367 PEIXOTO NETO, PAS; LOPES FILHO, J; CAETANO, LC; ALENCAR, LMC;
368 LEMOS; EEB. 2000. *Inhame: o Nordeste fértil*. Maceió: EDUFAL. 88p.

369

370 PHILLIPS, R.W.; BRUNT, A.A.; HULL R. 1999. The parcial characterization
371 of a Badanvirus infecting the greater Asiatic or Water yam (*Dioscorea alata*).
372 *Journal of Phytopathology* 147: 434-439.

373

374 PIO-RIBEIRO, G; MELO-FILHO, PA; KITAJIMA, EW; LIMA, SK; ANDRADE,
375 GP; DOMINGOS, CA; LIMA, ES. 2005. Detecção de potyvírus em inhame
376 em áreas produtoras de Pernambuco e obtenção de matrizes *in vitro*.
377 *Fitopatologia Brasileira* 30: S 183

378

379 PIO-RIBEIRO, G; ANDRADE, GP; FILOUX, D; VERNIER, P; MELO-FILHO,
380 PA; ALMEIDA, HSM; XAVIER, AS. 2006. Plantas de inhame em
381 Pernambuco e Paraíba apresentam infecções simples e mista por potyvírus
382 e badnavírus. *Fitopatologia Brasileira* 31: S 309.

383

384 RITZINGER, CHSP; SANTOS FILHO, HP; ABREU, KCLM; FANCELLI, M;
385 RITZINGER, R. 2003. Aspectos fitossanitários da cultura do inhame. Cruz
386 das Almas. *EMBRAPA/SPI* 39p.

387

388 SANTOS, ES. 1996. *Inhame (Dioscorea spp.): aspectos básicos da cultura*.
389 EMEPA-PB, SEBRAE, 158p.

390

391 SANTOS, ES. 2006. Manejo Sustentável da Cultura do Inhame. (*Dioscorea*
392 sp.) no Nordeste do Brasil, Disponível em: [http://](http://www.emepa.org.br/inhame_manejo.php)
393 www.emepa.org.br/inhame_manejo.php Acesso em: 15/12/06.

394

395 SANTOS, ES, MACÊDO, LS. 2006. Tendências e Potencialidades da
396 Cultura do Inhame (*Dioscorea* sp.) no Nordeste do Brasil, Disponível em:
397 http://www.emepa.org.br/inhame_tendencias.php Acesso em: 12/ 11/06.

398

399 SOUTO, ER; TESSMAN, DJ; NUNES, WNC. 2000. Métodos de PCR
400 aplicados à Fitopatologia. Belém. *Fitopatologia Brasileira* 27:22-46,

401

402 YANG, IC; HAFNER, GJ; REVILL, PA; DALE, JL; HARDING, RM. 2003.
403 Sequence diversity of South Pacific isolates of Taro bacilloform virus and the
404 development of a PCR-based diagnostic test. *Archives of Virology* 148:
405 1957-1968.

406

407 ZERBINI JR, FM; CARVALHO, MG; ZAMBOLIM, EM. 2002. *Introdução a*
408 *Virologia Vegetal* Viçosa, MG: UFV. 145p.

409

410

411

412

413

414

415

416

417

418

419

420

421

422

423

424

425

426

427 **Figura 1**



428

429 **Figura 2**



430

431

432

433

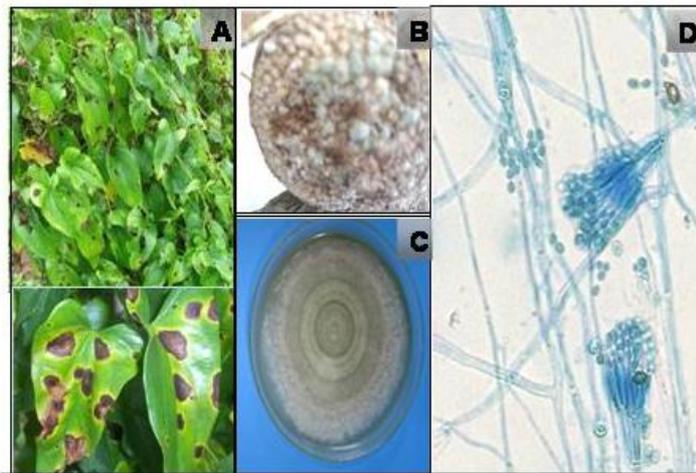
434

435

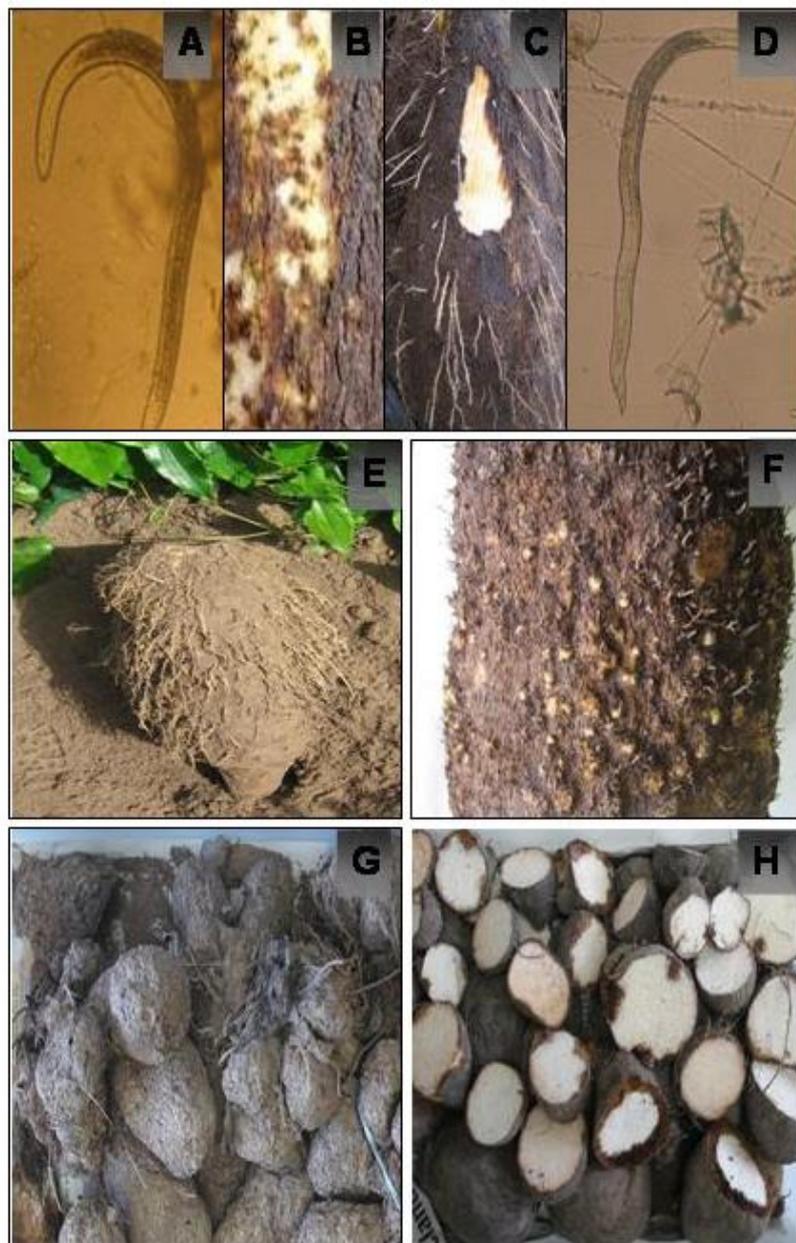
436

437

438 **Figura 3 e 4**



439



440

441

442

443

444

LEGENDA

445 **Figura 1.** Plantas de inhame em campo exibindo sintomas causados por
446 vírus. A- Sintoma de nanismo; B- Folha com mosaico intenso e
447 deformação foliar; C- Sintomas severos com distorção foliar
448 intensa causados pela infecção viral.

449

450

451 **Figura 2.** Plantas e túberas de inhame com danos causados pelas pragas.
452 A- Forma jovem da lagarta da folhagem; B- Folhas com
453 perfurações da lagarta; C- Túbera apresentando cochonilhas; D -
454 E-Túberas-semente com a broca da túbera e os respectivos
455 danos.

456

457

458 **Figura 3.** Sintomas em planta de inhame, túbera, crescimento e estruturas
459 de fungo. A- Pinta preta *Curvularia eragrostidis* e detalhe em
460 folha; B- Podridão verde *Penicillium sclerotigenum* em segmento
461 de túbera-semente; C- Crescimento em placa D- Estrutura do
462 patógeno.

463

464

465 **Figura 4.** Espécies de nematóides e danos em túberas-sementes e
466 comerciais. A- *Scutellonema bradys*; B e C- Inhame-da-Costa e
467 São Tomé com dano de casca preta; D- *Pratylenchus coffeae*;
468 E e F- *Meloidogyne* spp.; G e H- Túberas-semente antes e
469 depois do armazenamento.

CAPÍTULO III

**Infecções simples e mista causadas por duas espécies de
potyvírus e um badnavírus em *Dioscorea* spp. no
Nordeste do Brasil**

Infecções simples e mista causadas por duas espécies de potyvírus e um badnavírus em *Dioscorea* spp. no Nordeste do Brasil

G. P. Andrade^{1*}, G. Pio-Ribeiro^{1*}, D. Filoux², D. M. Xavier, A. K. S. Silva^{1**},
A.V. S. Nascimento¹, P. A. Melo-Filho¹,

¹Depto. de Agronomia, Fitossanidade, Universidade Federal Rural de Pernambuco, CEP: 52171-900, Recife, PE, e-mail: genira@ufrpe.br

²CIRAD, Montpellier, França; * Apoio CNPq/UFRPE; ** Bolsista

PIBIC/CNPq/UFRPE

Parte da Tese de Doutorado do primeiro autor apresentada à Universidade Federal Rural de Pernambuco.

(Aceito para publicação em: / /)

Autor para correspondência: Genira Pereira de Andrade

Andrade, G. P., Pio-Ribeiro, G., Filoux, D., Xavier, D. M., Silva, A. K. S., Nascimento, A.V. S. & Melo-Filho, P. A. Infecções simples e mista causadas por duas espécies de potyvírus e um badnavírus em *Dioscorea* spp. no Nordeste do Brasil. **Fitopatologia Brasileira**

RESUMO

Um isolado de *Yam mosaic virus* (YMV) e um de *Yam mild mosaic virus* (YMMV), obtidos de inhame (*Dioscorea* spp.), previamente identificados por RT-PCR e denominados QUI e ITA, foram inoculados mecanicamente em plantas indicadoras das famílias Chenopodiaceae, Leguminosae e

Solanaceae entre outras, sendo observados sintomas em *Nicotiana benthamiana* e *Gomphrena purpurea*. Os mesmos isolados foram inoculados em feijão-caupi, amendoim, *Emilia sonchifolia*, *G. purpúrea*, *N. benthamiana* e *N. glutinosa* com *Aphis gossypii* e *Toxoptera citricidus*, não se obtendo a transmissão viral e, por “leaf dip” e pelo método sorológico de microscopia eletrônica, verificaram-se partículas e inclusões típicas de potyvirus em material de ambos isolados. Das 135 amostras de túberas-semente de *D. alata* e do complexo *D. cayennensis-D. rotundata* coletadas em plantios comerciais, 90 plantadas em microparcels e 45 em casa de vegetação, estabeleceram-se 82 e 43, respectivamente, todas com sintomas semelhantes aos verificados no campo. As amostras trazidas de campos e testadas por ELISA indireto, com anti-soros contra *Cucumber mosaic virus* e *Cowpea aphid-borne mosaic virus* não apresentaram resultados positivos. Foi confirmada a identidade do isolado QUI como YMV por TAS-ELISA. Analisaram-se amostras de campos comerciais por PCR, para detecção de badnavirus com oligonucleotídeos degenerados e RT-PCR, para identificar YMV e YMMV, usando-se oligonucleotídeos específicos. Alguns produtos dessas reações foram purificados, seqüenciados e comparados com isolados de outros países, visando confirmar a ocorrência das três espécies virais em inhame na região Nordeste do Brasil. Verificaram-se, normalmente, mosaico severo juntamente com deformação foliar nas infecções mistas de potivírus com badnavirus e sintomas suaves nas infecções simples.

Palavras-chave adicionais: Inhame, *Yam mosaic virus*, *Yam mild mosaic virus*, badnavirus.

ABSTRACT

Single and mixed infections caused by two Potyvirus Species and Badnavirus in *Dioscorea* spp. in the Northeast of Brazil

An isolate of *Yam mosaic virus* (YMV) and one of *Yam mild mosaic virus* (YMMV), obtained from yam (*Dioscorea* spp.), previously identified by RT-PCR and called QUI and ITA were inoculated mechanically on indicator hosts of the families Chenopodiaceae, Leguminosae and Solanaceae, being observed symptoms in *Nicotiana benthamiana* e *Gomphrena purpurea*. The same isolates were inoculated on cowpea, peanut, *Emilia sonchifolia*, *N. benthamiana* and *N. glutinosa* with *Aphis gossypii* and *Toxoptera citricidus*, showing negative results. By leaf dip and immuno–electron microscopy it was observed particles and inclusions bodies typical of the potyviruses, for both isolates. Out of 135 samples of seed tubers of *D. alata* e *D. rotundata* collected in commercial fields, 90 were planted in micro plots and 45 under greenhouse, being established 82 and 43 plants, respectively, all showing symptoms similar to those observed in field. The samples from field analyzed by DAC-ELISA with antisera against *Cucumber mosaic virus* e *Cowpea aphid-borne mosaic virus* did not present positive results. It was confirmed the identity of the isolate QUI as YMV by TAS-ELISA. Field samples were analyzed by PCR for detecting badnavirus, with degenerated primers and RT-PCR for identification of the potyviruses YMV and YMMV, with specific primers. Some products of these reactions were purified, sequenced and compared with isolates of other countries in order to confirm the

occurrence of these three viral species in yam in the Northeast region of Brazil. Usually, it was verified strong mosaic and foliar distortion in mixed infection of potyvirus with badnavirus and light symptoms in single infections.

Additional key words: Yam, *Yam mosaic virus*, *Yam mild mosaic virus*, badnavírus.

INTRODUÇÃO

O inhame (*Dioscorea* spp.) é uma cultura que possui elevada importância sócio-econômica, em especial nos países em desenvolvimento situados nos trópicos, sendo difundido e cultivado em maior escala na África, Caribe, Ásia e Oceania (Mendes, 2005; Santos & Macêdo, 2006). Entre as raízes e tubérculos usados na alimentação humana, o inhame tem destaque por fornecer para populações rurais e urbanas, um produto de alto valor nutricional, consumido cozido ou frito e ser uma excelente fonte de carboidratos, sais minerais e vitaminas do complexo B, e ainda usado na fabricação de farinhas, bolos, tortas, doces e salgados (Santos, 1996; Menezes, 2002; Mendes, 2005). Além das espécies de *Dioscorea*, que produzem túberas comestíveis, existem outras que são exploradas para fabricação de cosméticos e contraceptivos, graças aos seus constituintes como os saponáceos e diosgenina (Pedralli, 2003; Santos & Macêdo, 2006).

No Brasil, a cultivar mais utilizada é o Inhame-da-Costa (Moura, 2005; Santos, 2006), pertencente à espécie *D. rotundata* Poir., comumente referida como parte do complexo *D. cayenensis* Lam.-*D. rotundata*, espécies vulgarmente conhecidas como inhame amarelo (“yellow yam”) e inhame branco (“white yam”), respectivamente (Malaurie *et al.*, 1998). Em segundo lugar encontra-se a cv. São-

Tomé, da espécie *D. alata* L. (Moura, 2005), conhecida como inhame água (“water yam”) (Malaurie *et al.*, 1998).

No Nordeste brasileiro tem crescido bastante a área plantada com inhame e tem havido uma importante demanda para o mercado de exportação, contudo, os produtores não têm conseguido atingir as metas das empresas de comércio exterior, principalmente pela baixa qualidade do produto devido a problemas de ordem fitossanitária (Moura, 2002; Santos & Macêdo, 2006).

Entre os diversos fatores limitantes da cultura do inhame encontram-se as doenças, incluindo as de etiologia viral. Várias espécies pertencentes aos gêneros *Potyvirus*, *Cucumovirus*, *Badnavirus* e *Potexvirus* foram descritas em *Dioscorea* spp. Duas espécies de *Potyvirus*, família *Potyviridae*, estão bem caracterizados, o *Yam mosaic virus* (YMV) e o *Yam mild mosaic virus* (YMMV), sendo o YMV considerado o vírus mais importante e de maior distribuição geográfica (Munford & Seal, 1997). Com grande importância para a cultura tem sido registrada, também, a ocorrência de vírus do gênero *Badnavirus*, família, *Caulimoviridae*, tanto em infecção simples como mista com potyvírus (Yang *et al.*, 2003; Boari, *et al.*, 2005; Pio-Ribeiro *et al.*, 2005; Andrade *et al.*, 2006). A propagação vegetativa, através de túberas-semente, utilizada na cultura do inhame facilita a sobrevivência, disseminação e o acúmulo de agentes virais em cultivos sucessivos, tendo sido observado 100% de plantas com sintomas a partir de material propagativo obtido de plantios comerciais (Brilhante *et al.*, 2005).

Nos estudos dos vírus que infectam o inhame, visando a identificação ao nível de espécie e caracterização de isolados, tem sido dada preferência aos métodos moleculares, os quais apresentam grande sensibilidade e especificidade

(Munford & Seal, 1997; Yang *et al.*, 2003; Odu *et al.*, 2004). Os testes sorológicos, embora sejam recomendados, o seu uso tem diminuído pela pouca disponibilidade de anti-soros específicos. Já os testes biológicos são mais ainda limitados porque mesmo nos casos em que os vírus são transmitidos experimentalmente por inoculação mecânica e por vetores resultados positivos são conseguidos com dificuldade. Para detecção e identificação ao nível de gênero, partículas e inclusões virais têm sido observadas ao microscópio eletrônico de transmissão (MET) (Ávila *et al.*, 1982; Boari, *et al.*, 2005).

O presente trabalho teve como objetivo identificar e caracterizar isolados virais obtidos da cv. Inhame-da-Costa e cv São Tomé em Pernambuco, Paraíba e Bahia, usando-se métodos biológicos, sorológicos e moleculares.

MATERIAL E MÉTODOS

Inoculação mecânica em plantas indicadoras

Para estudo de gama de hospedeiros foram escolhidos os isolados de YMV e YMMV, previamente identificados por RT-PCR (Pio-Ribbeiro, *et al.*, 2006), oriundos, respectivamente, de Quipapá-PE (QUI), da cv. Inhame-da-Costa e de Itapissuma-PE (ITA), da cv. São Tomé. Procedeu-se a inoculação de oito a vinte plantas das diferentes indicadoras pertencentes às famílias Chenopodiaceae, Leguminosae, Solanaceae, entre outras (Tabela 1). Amostras de folhas jovens de inhame foram maceradas na presença de solução tampão fosfato de potássio ($K_2HPO_4 + K_2HPO_4$), 0,05M, (pH 7,0) com 0,1% sulfito de sódio. O extrato obtido foi inoculado nas plantas-teste usando gaze, que estavam cobertas durante 24 horas antes da inoculação, previamente polvilhadas com Carborundum 400 Mesh.

Para cada indicadora foi realizado o tratamento, semelhante à inoculação, de cinco plantas-testemunha, usando-se apenas solução tampão. Foram realizadas leituras periódicas de sintomas locais e sistêmicos no período de quatro semanas, a partir da inoculação. Por amostragem, foram realizados testes de PCR para detecção de possíveis plantas infectadas de forma assintomática.

Inoculação por afídeos

Afídeos das espécies *Aphis gossypii* Glov. e *Toxoptera citricidus* Kirk, coletados respectivamente em algodoeiro (*Gossypium* sp.) e plantas cítricas (*Citrus* sp.), mantidos em jejum durante duas horas, foram colocados sobre a superfície de folhas de inhame infectadas com os isolados QUI e ITA, respectivamente, em placas de Petri, por um período de acesso em torno de cinco horas e transferidos para plantas-teste (cinco insetos por planta) de feijão-caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.), amendoim (*Arachis hypogaea* L.), *Emilia sonchifolia*, *Nicotiana benthamiana* e *N. glutinosa*. Para as plantas-testemunhas, seguiu-se o mesmo procedimento, com acesso dos insetos em plantas saudáveis. As leituras foram realizadas durante quatro semanas, com base na sintomatologia comparando-se sempre com as testemunhas. Foi feita amostragem e realizado teste de PCR para verificar se havia plantas infectadas de maneira assintomática.

Técnica “leaf dip” e método sorológico de microscopia eletrônica

Para análise usando-se “leaf dip” amostras foliares de inhame com os isolados QUI e ITA foram cortadas em pequenos fragmentos, mergulhadas em gotas de água destilada para que as partículas virais entrassem em suspensão.

Em seguida, as telinhas ou grades, cobertas com película de Formvar, reforçada com carbono, foram colocadas sobre a água contendo o material, as quais permaneceram em repouso por cinco minutos. Após esse período, as mesmas foram secas em papel filtro, contrastadas negativamente com acetato de uranila a 2% durante um minuto, lavadas com água destilada, secas a temperatura ambiente e organizadas em estojos apropriados e observadas ao MET no Núcleo de Apoio a Pesquisa em Microscopia Eletrônica Aplicada a Pesquisa Agropecuária - NAP/MEPA-ESALQ.

Para análise usando-se o método sorológico de microscopia eletrônica, telas revestidas com Formvar e Carbono foram imersas em gotas de anticorpos contra YMV e na diluição de 1:500, durante 30 min e lavadas com solução tampão TRIS. Amostras com o isolado QUI foram maceradas em tampão TRIS. As telas tratadas com anti-soros foram colocadas sobre uma gota do extrato vegetal, permanecendo por 4h em câmara úmida. Em seguida, foram lavadas com dez gotas de solução tampão TRIS, coradas com acetato de uranila a 2%, lavadas com água destilada em jato contínuo de uma pisseta durante vinte segundos e colocadas para secar a temperatura ambiente e observada ao MET.

Análises sorológicas das plantas oriundas de campo comercial

Amostras da cv. Inhame-da-Costa e da cv. São Tomé oriundas de cultivos comerciais foram analisadas empregando-se Direct antigen coating ELISA (DAC-ELISA), utilizando-se anti-soros contra *Cucumber mosaic virus* (CMV) e *Cowpea aphid-borne mosaic virus* (CABMV). Os isolados QUI e ITA foram também testados por “triple antibody sandwich” (TAS-ELISA), com um conjunto de anticorpos policlonais e monoclonais específicos para YMV, obtidos do IITA, Nigéria. Foram

realizadas leituras a 405 nm, sendo considerado positivos valores duas vezes superiores à absorção do controle negativo.

Transmissão por túberas-semente

Foram coletadas túberas-sementes das cultivares Inhame-da-Costa e São Tomé em 12 campos que apresentavam plantas com sintomas típicos de viroses nas áreas produtoras de Pernambuco, Paraíba e Bahia, as quais foram plantadas, sendo 90 em microparcels instaladas em área experimental e 45 em condições de casa de vegetação, usando vasos com capacidade para 5 kg contendo uma mistura de solo e pó de coco (peneirado) na proporção de 3:1. Após a germinação, as plantas foram adubadas com Nitrogênio, Fósforo e Potássio (NPK) e pulverizadas duas vezes ao mês visando o controle de pragas, e avaliadas visualmente quanto à presença ou ausência de sintomas. De cada local e espécie de inhame foram escolhidas amostras para realização de análise por PCR e RT-PCR, visando à confirmação de infecção viral.

Análise através de RT-PCR e determinação de seqüências

As análises de RT-PCR e determinação de seqüências foram realizadas com a colaboração do Dr. Denis Filloux (CIRAD, França). Os isolados constantes deste estudo foram denominados usando a sigla do município de origem: Bonito (BON), ITA, QUI, São Joaquim do Monte (SJM) de Pernambuco; Conde (CND) da Paraíba e Cruz das Almas (CRA) da Bahia.

Amostras de plantas oriundas de 12 campos comerciais dos Estados envolvidos no estudo e das estabelecidas em microparcels e em casa de vegetação e material de plantas oriundas de túberas de QUI e ITA foram analisadas por PCR e RT-PCR. Procedendo-se primeiramente, com a maceração

das amostras em tampão de carbonato, estéril, acrescido de 2% de PVP e 1% de sulfito de sódio a 1:10 (p/v), onde permaneceram em geladeira por um período de 12h. A lavagem dos tubos foi realizada com tampão PBS-Tween, por duas vezes e uma vez com água Miliq esterelizada. Em seguida, foi utilizado kit One Step RT-PCR (Invitrogen) com pares de oligonucleotídeos específicos para YMMV CP 2F (5'-GGCACACATGCAAATGAAAGC-3') e UTR 1R (5'-CACCAGTAGAGTGAACATAG-3') Munford; Seal (1997) e YMV CP 1F (5'-ATCCGGGATGTGGACAATGA-3') e UTR 1R (5'-TGGTCCTCCGCCACATCAAA-3') Munford; Seal (1997) e degenerados para badnavírus BadnaFP (5'ATGCCITTYGGIITIAARAAAYGCICC3') e BadnaRP (5'CCAYTTRCAIACISCICCCCAICC3') Yang et al., 2003, empregados conforme instruções do fabricante.

A visualização dos resultados foi feita através de análise em gel de agarose com tampão TAE e os produtos de PCR foram purificados usando o "kit GFX PCR DNA and Gel Band purification Kit" com "Low Mass Ladder" (Invitrogen) de acordo com as recomendações do fabricantes e o sequenciamento foi realizado com o aparelho seqüenciador GE Healthcare MegaBase 1000 e foi utilizado o Kit Dye Terminator da GE Healthcare estes dois procedimentos foram realizados no Laboratório de Genoma Humano da Universidade de São Paulo (USP).

A visualização dos resultados foi feita através de análise em gel de agarose a 1,2% com tampão TAE e os produtos de PCR foram purificados usando o "kit GFX PCR DNA and Gel Band purification Kit" com "Low Mass Ladder" (Invitrogen) de acordo com as recomendações dos fabricantes e o sequenciamento foi realizado com o aparelho seqüenciador GE Healthcare MegaBase 1000 utilizando o Kit Dye Terminator da GE Healthcare estes dois procedimentos

foram realizados no Laboratório de Genoma Humano da Universidade de São Paulo (USP).

As seqüências de nucleotídeos foram comparadas com seqüências de potyvírus e badnavírus relacionados disponíveis no GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/GenBank). Alinhamentos múltiplos foram obtidos utilizando-se o programa Clustal W (www.ebi.ac.uk/Clustalw) e procedeu-se com a construção de uma árvore utilizando-se o programa MEGA 3.1 (www.megasoftware.net), pelo método de *neighbour-joining* com 2000 repetições.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Inoculação mecânica e por afídeos

Na análise da inoculação mecânica foi constatado desenvolvimento de sintomas de mosaico e deformação foliar em plantas de *N. benthamiana* e mosaico *G. purpúrea* inoculada com o isolado QUI. Este resultado contrasta com aqueles obtidos por Ávila *et al.*, (1982) que não observaram transmissão de um isolado de potyvírus estudado em plantas de inhame na Bahia para plantas indicadoras. Transmissão mecânica de um potívirus de inhame para inhame foi constatada em nove de 24 genótipos inoculados (Odu *et al.*, 2004).

Nos testes de transmissão dos dois isolados por afídeos não foi observado o desenvolvimento de sintomas em nenhuma das plantas inoculadas. Contudo, Odu *et al.* (2004) observaram transmissão de um potívirus de inhame para inhame, empregando-se *Aphis craccivora* em 10 de 24 genótipos testados.

A ampla distribuição e susceptibilidade do YMV em plantas de Inhame-da-Costa é alta na região da Mata Norte, Sul e litoral dos Estados de Pernambuco e Paraíba, no entanto, plantas da cv. São Tomé apresentou sintoma mais suave em ocorrência de infecção simples (Figura 1A) e sintomas mais intensos, até de cordão de sapato quando ocorre em infecções com duas espécies virais (Pio-Ribeiro et al., 2006).

Técnica “leaf dip” e método sorológico de microscopia eletrônica

Foram observadas partículas virais típicas do gênero *Potyvirus*, tanto nas amostras de cv. Inhame-da-Costa e da cv. São Tomé. Este resultado foi semelhante ao de Ávila et al. (1982) que observaram partículas alongadas de 680nm em preparações “leaf dip” em inhame-da-Costa. Este método tem se mostrado uma forma rápida de detecção de vírus em inhame. Com o método sorológico de microscopia eletrônica foram observadas partículas virais do gênero *Potyvirus* nas amostras do isolado QUI (Figura 1 B).

Transmissão via de túberas-sementes

Das 90 túberas-sementes plantadas em microparcels 82 se estabeleceram e das 45 em casa de vegetação 43 deram origem a plantas, as quais foram inicialmente analisadas visualmente. Com a análise das amostras por PCR e RT-PCR foi possível associar os sintomas (Figura 2 A - F) tanto na cv. Inhame-da-Costa como na cv. São Tomé com a presença de vírus. Houve a confirmação de que 100% das plantas reproduziram sintomas idênticos aos observados em campo, confirmando-se a transmissão por túberas-sementes demonstrando que é possível à disseminação do agente causal por meio do material de propagação.

Foi observado também que no rebrotamento de túberas oriundas de vasos e microparcelas há a presença do mesmo sintoma. Estes resultados concordam com os obtidos por Brillhante *et al.*, 2005. Esta constatação está de acordo com as informações da literatura consultada tendo em vista se tratar de propagação vegetativa (Bousalem *et al.*, 2000).

Nos plantios comerciais em Pernambuco e Paraíba se verificou que não existe alta frequência de infecção mista com os dois potyvírus, no entanto, ocorre mais comumente registro de um ou outro com badnavírus embora em alguns casos tenha se confirmado infecção por três espécies, constatação que deve ser mais bem investigada por haver possibilidade de detectar outras espécies como, por exemplo, potexvírus nas áreas estudadas se estendendo para um número maior de campos tanto para cv. Inhame-da-Costa como na São Tomé (Pio-Ribeiro *et al.*, 2006).

A análise através de RT-PCR e determinação de seqüências

Com as análises de RT-PCR dos isolados virais oriundos de campos de Pernambuco, Paraíba e Bahia, foi possível determinar a infecção de YMV, YMMV e badnavírus em infecção simples ou mista como pode ser visualizado na Figura 3 A. Nas amplificações via RT-PCR utilizando um par de oligonucleotídeos (YMV-CP 1F e YMV-UTR 1F) para os isolados QUI, BON, verificou-se a presença de um fragmento de aproximadamente 586 pares de bases, entretanto, para as amplificações utilizando um par de oligonucleotídeos (YMMV-CP 2F e YMMV-UTR-1F) para os isolados SJM e CND verificou-se a presença de um fragmento de aproximadamente 249 pares de bases (Figura 3 A). A partir dos fragmentos amplificados obteve-se as seqüências parciais referente à região C terminal da

capa protéica (CP) para os quatro isolados. Com a amplificação das amostras para badnavírus se constatou fragmento de 579 pares de base (Figura 3B)

Os isolados QUI e BON quando comparados SJM e CND apresentam similaridade de aproximadamente 78%, indicando se tratar de espécies diferentes (Figura 4), e quando comparados com outros potyvírus apresentaram maior similaridade com isolados de YMV (95,7% a 96,2%). No entanto, os isolados SJM e CND apresentaram maior similaridade com os isolados de YMMV (89,8% a 95,2%).

No agrupamento filogenético preparado a partir das seqüências de nucleotídeos dos isolados QUI, BON, SJM e CND e de outros potyvírus disponíveis no GenBank observou-se a formação de grupos distintos entre os isolados, ou seja, os isolados QUI e BON agruparam-se no mesmo ramo da espécie YMV, ficando mais próximo das seqüências YMV-GrSavaneC4, já os isolados SJM e CND foram agrupados com os isolados de YMMV distantes dos isolados de YMV (Figura 4).

A comparação das seqüências parciais dos isolados QUI, ITA CRA, referente a ORF III confirmou a presença de *Dioscorea alata bacilliform virus* (DABV) com aproximadamente 97% de similaridade e baixa homologia (75%) com o isolado DSBV-B 39-6 disponível no GenBank. É interessante ressaltar que foi detectada infecção mista por badnavírus e potyvírus em isolados das várias regiões dos dois Estados (Figura 3 e 5). e entre os escolhidos para serem seqüenciados em QUI se verificou a ocorrência de infecção com YMV e DABV, confirmando infecção mista causada por duas espécies virais distintas.

A árvore filogenética preparada a partir das seqüências parciais dos isolados de QUI, ITA e CRA e de outros badnavírus relacionados é apresentada na

Figura 6. Os isolados QUI, ITA e CRA se agruparam no mesmo ramo dos isolados de DABV e distantes isolado DSBV-B39-6, que na literatura está descrito como uma nova espécie (Seal & Muller, 2007). É possível observar no agrupamento filogenético que os isolados QUI e ITA (Pernambuco) estão mais próximos entre si quando comparados com o isolado de CRA (Bahia) (Figura 7) indicando uma correlação entre as seqüências e a distribuição geográfica dos isolados. Dessa forma, estudos adicionais serão necessários para estudos da seqüência completa para maior número de amostras e áreas de coleta. Foi possível avaliar a similaridade dos isolados das áreas fisiográficas constantes do estudo se confirmando a ocorrência de três espécies virais em inhame na região nordeste do Brasil.

A epidemiologia da doença causada por YMV e YMMV, não está definida por não existir evidência de qual é a fonte primária de inóculo deste vírus para o inhame, mais uma dificuldade para que sejam tomadas medidas eficientes para o controle desses patógenos em campo. Baseado nos estudos de caracterização do YMV verificou-se que as características biológicas do isolado de Potyvirus do inhame referidos por Ávila et al. (1982) não diferem daquelas apresentadas pelos isolados estudados por Pio-Ribeiro et. al., 2006 e dos resultados obtidos no estudo de Andrade et al., 2006.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof^o Elliot W. Kitajima pela colaboração na análise de MET e ao estagiário André da Silva Xavier pela colaboração no processamento das amostras.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALEMAN, M. E., MARCOS, J.F., BRUGIDOU, C., BEACHY, R.N. & FAUQUET, C. The complete nucleotide sequence of Yam mosaic vírus (Ivory Coast isolate) genomic RNA. **Archives of Virology**, v.141, n.7, p.1259-1278, 1996.

ALMEIDA, A.M.R. Detecção e quantificação de vírus por ELISA. In: ALMEIDA, A.M.R.;A.A. (Eds.) Princípios e técnicas de diagnose aplicadas em Fitovirologia. p.63-94, 2001.

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.

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

ÁVILA, A.C., GAMA, M.I.C.S. & KITAJIMA, E.W. Detecção de um *Potyvirus* em inhame (*Dioscorea* spp.) no Brasil. **Fitopatologia Brasileira**. v.7, n.1, p.447-452, 1982.

BOARI, A.J., AZEVEDO, V.G., SILVA-MANN, R., FRANCO-FILHO, E. & KITAJIMA, E.W. Ocorrência de *Badnavirus* e *Potyvirus* em inhame (*Dioscorea* sp.) no estado de Sergipe. **Summa Phytopathologica**, v.31, p.35-36, 2005.

BOUSALEM, M., DALLLOT, S., FUJI, S., NATSUAKI, K.T. 2003. Origin, world-wide dispersion, bio-geographical diversification, radiation and recombination: an evolutionary history of *Yam mild mosaic virus* (YMMV). **Infection, genetics and evolution**. 3: 189-206.

DUTERME, O., COLINET, D., KUMMERT, J. & LEPOIVRE, P. Determination of the taxonomic position and characterization of Yam mosaic virus isolates based on sequence data of the 5-terminal part of the coat protein cistron. **Archives of Virology**. v.141, n.6, p.1067-1075, 1996.

HEARON, S.S. An ultrastructure study of *Dioscorea* spp. infected with two flexuous rot viruses. **Proceedings American Phytopathological Society**. v.1, p.151, 1974.

LAWSON, R. H., HEARON, S. S., SMITH, F. F. & KAHN, R. P. Electron microscopy and separation of viruses in *Dioscorea floribunda*. **Phytopathology**. v.63, p.1435, 1973.

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. **EJB Electronic Journal of biotechnology**. v.1, n.3, p.1-15 1998.

MENDES, R.A. Cultivando inhame ou Cará da Costa. Cruz das Almas. EMBRAPA. **Circular Técnica n. 4**. 2005, 26p.

MENEZES, M. Condições epidemiológicas de doenças fúngicas na cultura do inhame. In: SANTOS, E.S. (Coord.) **Simpósio Nacional sobre as culturas do Inhame e do Taro**. Simpósio Nacional sobre as culturas do Inhame e do Taro. João Pessoa, v.2, p.50-67, 2002.

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

MOURA, R.M. Problemas fitossanitários do inhame no Nordeste e proposta para um sistema integrado de controle. In: SANTOS, E.S. (Coord.) **Simpósio Nacional sobre as culturas do Inhame e do Taro**. João Pessoa, v.2, p.68-72, 2002.

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

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

PEDRALLI, G. *Dioscoreaceae e Araceae*: aspectos taxonômicos, etnobotânicos e espécies nativas com potencial para melhoramento genético. In: SANTOS, E.S. (Coord.) **Simpósio Nacional sobre as culturas do Inhame e do Taro**, v.2, p.39-53, 2002.

PHILLIPS, R.W., BRUNT, A.A. & HULL R. The partial characterization of a Badnavirus infecting the greater Asiatic or Water yam (*Dioscorea alata*). **Journal of Phytopathology**, v.147, p.434-439, 1999.

PIO-RIBEIRO, G., MELO-FILHO, P.A., KITAJIMA, E.W., LIMA, S.K., ANDRADE, G.P. & DOMINGOS, C.A. Detecção de potyvírus em inhame em áreas produtoras de Pernambuco e obtenção de matrizes *in vitro*. **Fitopatologia Brasileira**, v.30, p.S 183, 2005.

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**, v.31, p.S 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. **Documentos EMBRAPA/SPI**, 2003, 39p.

SANTOS, E. S.; MACÊDO, L.S. Tendências e Potencialidades da Cultura do Inhame (*Dioscorea* sp.) no Nordeste do Brasil, 2006. Disponível em: http://www.emepa.org.br/inhame_tendencias.php Acesso em: 12/ 11/06.

SANTOS, E. S. Manejo Sustentável da Cultura do Inhame. (*Dioscorea* sp.) no Nordeste do Brasil, 2006. Disponível em: http://www.emepa.org.br/inhame_manejo.php Acesso em: 15/12/06.

SANTOS, E.S. **Inhame (*Dioscorea* spp.): aspectos básicos da cultura**. João Pessoa: EMEPA-PB, SEBRAE, 1996. 158p.

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, 829-832, 2007.

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

Tabela 1.

Origem	Espécie	Sintomas na planta	Teste realizado	Reações em ELISA** ¹	RT-PCR		PCR
					YMV	YMMV	DaBV
Paraíba							
Alhandra	Inhane-da-Costa	Mosaico intenso	DAC-ELISA*	-	+	-	+
Conde	Inhane-da-Costa	Mosaico intenso, "cordão de sapato"	DAC-ELISA	-	+	-	+
Conde	São Tomé	Mosaico intenso	DAC-ELISA	-	-	+	+
Pitimbu	Inhane-da-Costa	Mosaico intenso, "cordão de sapato"	DAC-ELISA	-	+	-	+
Bahia							
Cruz das Almas	Inhane-da-Costa	Mosaico intenso	TAS-ELISA	-	+	+	+
Pernambuco							
Aliança	Inhane-da-Costa	Mosaico intenso	DAC-ELISA	-	-	+	+
Aliança	São Tomé	Mosaico suave	Nt	Nt	-	+	+
Bonito	Inhane-da-Costa	Mosaico intenso	DAC-ELISA	-	-	+	-
Condado	Inhane-da-Costa	Mosaico intenso	Nt	Nt	+	-	+
Condado	São Tomé	Mosaico suave	Nt	Nt	+	-	+
Goiana	Inhane-da-Costa	Mosaico suave	DAC-ELISA	-	+	-	+
Goiana	São Tomé	Mosaico suave	Nt	Nt	-	+	+
Quipapá	Inhane-da-Costa	Mosaico intenso	TAS-ELISA	+	+	-	+
Itapissuma	São Tomé	Mosaico intenso	TAS-ELISA	-	-	+	+
Vitória de Santo Antão	São Tomé (folha grande)	Mosaico intenso, clareamento de nervura	DAC-ELISA	-	-	+	+
Vitória de Santo Antão	São Tomé (folha pequena)	Mosaico suave	DAC-ELISA	-	-	+	+
DEPA/UFRPE	São Tomé	Assintomático	DA-ELISA	-	-	-	-
DEPA/UFRPE	<i>Dioscorea</i> sp.	Mosaico Suave	DAC-ELISA	-	+	-	-

*Anti-soro utilizados no DAC-ELISA: CMV

** Anti-soro utilizados no TAS-ELISA: YMV, CMV e CABMV.

¹ Apenas para as amostras de Quipapá e Itapissuma se utilizou os três anti-soros

Nt= Não testado

Figura 1, 2 e 3

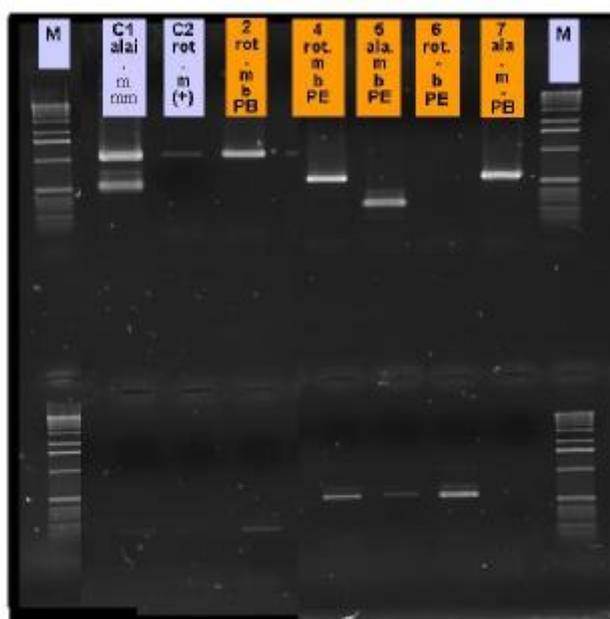
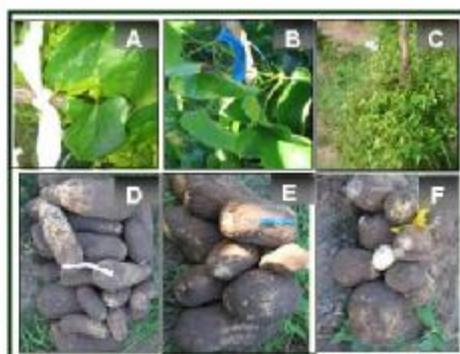
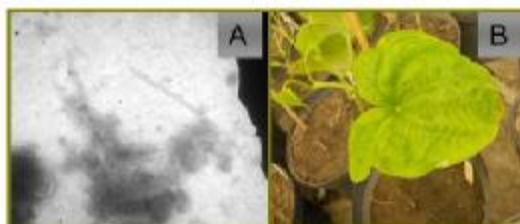


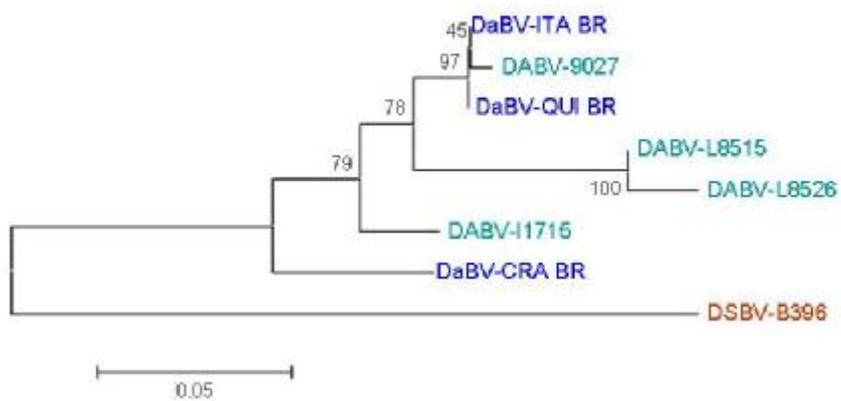
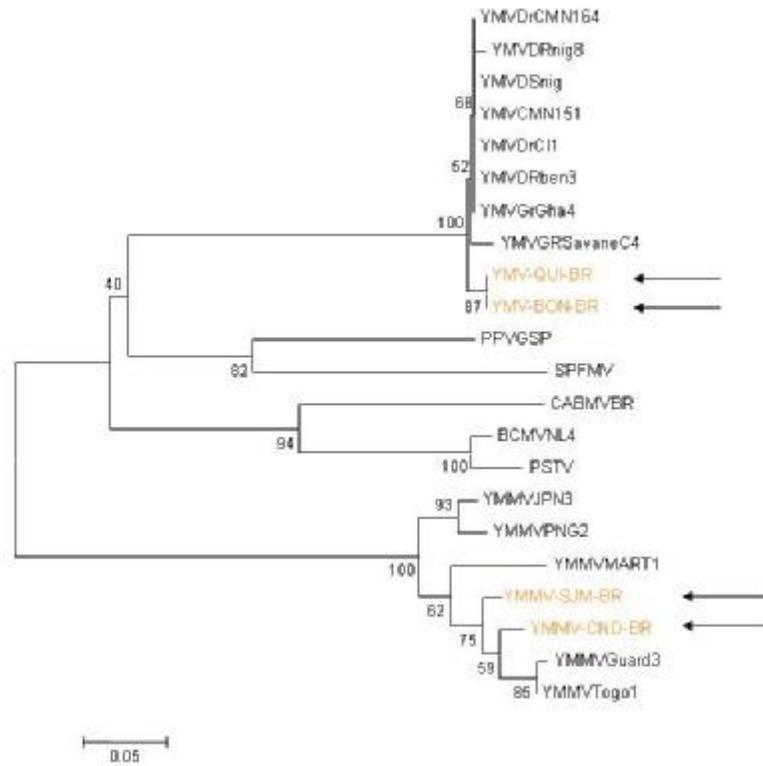
Fig 4.

YMV_DrCDI1.seq	ATGATCGACGGTGGGAGCACTGGGATAACCATTCAAAC	40
YMV_DrNig8.seq	ATGATCGACGGTGGGAGCACTGGGATAACCATTCAAAC	40
YMV_DrCMN_164.seq	ATGATCGACGGTGGGAGCACTGGGATAACCATTCAAAC	40
YMV_Dr_ben3.seq	ATGATCGACGGTGGGAGCACTGGGATAACCATTCAAAC	40
YMV_GR_savaneC4.seq	ATGATCGACGGTGGGAGCACTGGGATAACCATTCAAAC	40
YMV_DSnig.seq	ATGATCGACGGTGGGAGCACTGGGATAACCATTCAAAC	40
YMV_GrGha4.seq	ATGATCGACGGTGGGAGCACTGGGATAACCATTCAAAC	40
GPR1.seq	ATGAAAGACGGTGGGAGCACTGGGATAACCATTCAAAC	40
GPR2.seq	ATGATCGACGGTGGGAGCACTGGGATAACCATTCAAAC	40
Consensus	atga gacggtg gtagca gtgga ta ccatt caaac	
YMV_DrCDI1.seq	CGATCATAGAAATGCCAAACCACATTCGTCAGATAAT	80
YMV_DrNig8.seq	CGATCATAGAAATGCCAAACCACATTCGTCAGATAAT	80
YMV_DrCMN_164.seq	CGATCATAGAAATGCCAAACCACATTCGTCAGATAAT	80
YMV_Dr_ben3.seq	CGATCATAGAAATGCCAAACCACATTCGTCAGATAAT	80
YMV_GR_savaneC4.seq	CGATCATAGAAATGCCAAACCACATTCGTCAGATAAT	80
YMV_DSnig.seq	CGATCATAGAAATGCCAAACCACATTCGTCAGATAAT	80
YMV_GrGha4.seq	CGATCATAGAAATGCCAAACCACATTCGTCAGATAAT	80
GPR1.seq	CGATCATAGAAATGCCAAACCACATTCGTCAGATAAT	80
GPR2.seq	CGATCATAGAAATGCCAAACCACATTCGTCAGATAAT	80
Consensus	cg tcataga aatgccaaaccaca ttcgtcagataat	
YMV_DrCDI1.seq	GATGCATTTAGTGACCGAGCTGAAGCGTACATTGAATTG	120
YMV_DrNig8.seq	GATGCATTTAGTGACCGAGCTGAAGCGTACATTGAATTG	120
YMV_DrCMN_164.seq	GATGCATTTAGTGACCGAGCTGAAGCGTACATTGAATTG	120
YMV_Dr_ben3.seq	GATGCATTTAGTGACCGAGCTGAAGCGTACATTGAATTG	120
YMV_GR_savaneC4.seq	GATGCATTTAGTGACCGAGCTGAAGCGTACATTGAATTG	120
YMV_DSnig.seq	GATGCATTTAGTGACCGAGCTGAAGCGTACATTGAATTG	120
YMV_GrGha4.seq	GATGCATTTAGTGACCGAGCTGAAGCGTACATTGAATTG	120
GPR1.seq	GATGCATTTAGTGACCGAGCTGAAGCGTACATTGAATTG	120
GPR2.seq	GATGCATTTAGTGACCGAGCTGAAGCGTACATTGAATTG	120
Consensus	gatgcattt agtgcgc gctgaagcgta attgaattg	
YMV_DrCDI1.seq	CGGAACTCAAAAGAACCCTATGCCCCATACGGTATTC	160
YMV_DrNig8.seq	CGGAACTCAAAAGAACCCTATGCCCCATACGGTATTC	160
YMV_DrCMN_164.seq	CGGAACTCAAAAGAACCCTATGCCCCATACGGTATTC	160
YMV_Dr_ben3.seq	CGGAACTCAAAAGAACCCTATGCCCCATACGGTATTC	160
YMV_GR_savaneC4.seq	CGGAACTCAAAAGAACCCTATGCCCCATACGGTATTC	160
YMV_DSnig.seq	CGGAACTCAAAAGAACCCTATGCCCCATACGGTATTC	160
YMV_GrGha4.seq	CGGAACTCAAAAGAACCCTATGCCCCATACGGTATTC	160
GPR1.seq	CGGAACTCAAAAGAACCCTATGCCCCATACGGTATTC	160
GPR2.seq	CGGAACTCAAAAGAACCCTATGCCCCATACGGTATTC	160
Consensus	cggaactcaaaagaacccta atgcccc atacggtattc	
YMV_DrCDI1.seq	AGCGCAATTCAGGGAATACTCATTTGGCAGATATGCGTT	200
YMV_DrNig8.seq	AGCGCAATTCAGGGAATACTCATTTGGCAGATATGCGTT	200
YMV_DrCMN_164.seq	AGCGCAATTCAGGGAATACTCATTTGGCAGATATGCGTT	200
YMV_Dr_ben3.seq	AGCGCAATTCAGGGAATACTCATTTGGCAGATATGCGTT	200
YMV_GR_savaneC4.seq	AGCGCAATTCAGGGAATACTCATTTGGCAGATATGCGTT	200
YMV_DSnig.seq	AGCGCAATTCAGGGAATACTCATTTGGCAGATATGCGTT	200
YMV_GrGha4.seq	AGCGCAATTCAGGGAATACTCATTTGGCAGATATGCGTT	200
GPR1.seq	AGCGCAATTCAGGGAATACTCATTTGGCAGATATGCGTT	200
GPR2.seq	AGCGCAATTCAGGGAATACTCATTTGGCAGATATGCGTT	200
Consensus	agcgcaa tt aggga tactcattggc agatatgcggt	
YMV_DrCDI1.seq	CGAATTCATAGATAAATCTAAAACCCAGTTCGAGCG	240
YMV_DrNig8.seq	CGAATTCATAGATAAATCTAAAACCCAGTTCGAGCG	240
YMV_DrCMN_164.seq	CGAATTCATAGATAAATCTAAAACCCAGTTCGAGCG	240
YMV_Dr_ben3.seq	CGAATTCATAGATAAATCTAAAACCCAGTTCGAGCG	240
YMV_GR_savaneC4.seq	CGAATTCATAGATAAATCTAAAACCCAGTTCGAGCG	240
YMV_DSnig.seq	CGAATTCATAGATAAATCTAAAACCCAGTTCGAGCG	240
YMV_GrGha4.seq	CGAATTCATAGATAAATCTAAAACCCAGTTCGAGCG	240
GPR1.seq	CGAATTCATAGATAAATCTAAAACCCAGTTCGAGCG	240
GPR2.seq	CGAATTCATAGATAAATCTAAAACCCAGTTCGAGCG	240
Consensus	cga ttc taga ataac tc aaaactccagttcgagcg	
YMV_DrCDI1.seq	CGTGAAGCCACCATCAGATGAAACGAGCAGCTATTGGAA	280
YMV_DrNig8.seq	CGTGAAGCCACCATCAGATGAAACGAGCAGCTATTGGAA	280
YMV_DrCMN_164.seq	CGTGAAGCCACCATCAGATGAAACGAGCAGCTATTGGAA	280
YMV_Dr_ben3.seq	CGTGAAGCCACCATCAGATGAAACGAGCAGCTATTGGAA	280
YMV_GR_savaneC4.seq	CGTGAAGCCACCATCAGATGAAACGAGCAGCTATTGGAA	280
YMV_DSnig.seq	CGTGAAGCCACCATCAGATGAAACGAGCAGCTATTGGAA	280
YMV_GrGha4.seq	CGTGAAGCCACCATCAGATGAAACGAGCAGCTATTGGAA	280
GPR1.seq	CGTGAAGCCACCATCAGATGAAACGAGCAGCTATTGGAA	280
GPR2.seq	CGTGAAGCCACCATCAGATGAAACGAGCAGCTATTGGAA	280
Consensus	cgtgaagc caccatcagatgaa acgagcagctattggaa	
YMV_DrCDI1.seq	ACAACTTACAAAATGTTGGATTTGATGGCAAAGTGGG	320
YMV_DrNig8.seq	ACAACTTACAAAATGTTGGATTTGATGGCAAAGTGGG	320
YMV_DrCMN_164.seq	ACAACTTACAAAATGTTGGATTTGATGGCAAAGTGGG	320
YMV_Dr_ben3.seq	ACAACTTACAAAATGTTGGATTTGATGGCAAAGTGGG	320
YMV_GR_savaneC4.seq	ACAACTTACAAAATGTTGGATTTGATGGCAAAGTGGG	320
YMV_DSnig.seq	ACAACTTACAAAATGTTGGATTTGATGGCAAAGTGGG	320
YMV_GrGha4.seq	ACAACTTACAAAATGTTGGATTTGATGGCAAAGTGGG	320
GPR1.seq	ACAACTTACAAAATGTTGGATTTGATGGCAAAGTGGG	320
GPR2.seq	ACAACTTACAAAATGTTGGATTTGATGGCAAAGTGGG	320
Consensus	acaa cttacaaaatgttggatttgatggcaaatggg	
YMV_DrCDI1.seq	TTCCAGGAAGAGGATACAGAGACACGCTGCACTGTAT	360
YMV_DrNig8.seq	TTCCAGGAAGAGGATACAGAGACACGCTGCACTGTAT	360
YMV_DrCMN_164.seq	TTCCAGGAAGAGGATACAGAGACACGCTGCACTGTAT	360
YMV_Dr_ben3.seq	TTCCAGGAAGAGGATACAGAGACACGCTGCACTGTAT	360
YMV_GR_savaneC4.seq	TTCCAGGAAGAGGATACAGAGACACGCTGCACTGTAT	360
YMV_DSnig.seq	TTCCAGGAAGAGGATACAGAGACACGCTGCACTGTAT	360
YMV_GrGha4.seq	TTCCAGGAAGAGGATACAGAGACACGCTGCACTGTAT	360
GPR1.seq	TTCCAGGAAGAGGATACAGAGACACGCTGCACTGTAT	360
GPR2.seq	TTCCAGGAAGAGGATACAGAGACACGCTGCACTGTAT	360
Consensus	ttccaggaagaggatacaga agacacgctgca ctgtat	
YMV_DrCDI1.seq	GTCACGAAAGACATGCACAGCCTTTAGGCATGAGAGGT	399
YMV_DrNig8.seq	GTCACGAAAGACATGCACAGCCTTTAGGCATGAGAGGT	400
YMV_DrCMN_164.seq	GTCACGAAAGACATGCACAGCCTTTAGGCATGAGAGGT	399
YMV_Dr_ben3.seq	GTCACGAAAGACATGCACAGCCTTTAGGCATGAGAGGT	399
YMV_GR_savaneC4.seq	GTCACGAAAGACATGCACAGCCTTTAGGCATGAGAGGT	399
YMV_DSnig.seq	GTCACGAAAGACATGCACAGCCTTTAGGCATGAGAGGT	400
YMV_GrGha4.seq	GTCACGAAAGACATGCACAGCCTTTAGGCATGAGAGGT	399
GPR1.seq	GTCACGAAAGACATGCACAGCCTTTAGGCATGAGAGGT	399
GPR2.seq	GTCACGAAAGACATGCACAGCCTTTAGGCATGAGAGGT	399
Consensus	gtcacgaaagacatgcacagcctttt aggcattgagaggt	

Fig 5.

Ymmv_guard_3.seq	CAAATGAAA GCAGCAGCTT TACGGAA TACCAGAA CTGGTC	40
YMMV_togo_1.seq	CAAATGAAAGGCAGCAGCTT TACGGAA TACCAGAA CTGGTC	40
GPR4.seq	CAAATGAAA GCAGCAGCTT TACGGAA CACCAGAA CTGGTC	40
GPR3.seq	CAAATGAAA GCAGCAGCTT TACGGAA CACCAGAA TCGAC	40
YMMV_mart1.seq	CAAATGAAA GCAGCAGCTT TACGGAA CACCAGAA CTGGTC	40
YMMV_JPN_3.seq	CAAATGAAAGGCAGCAGCTT TACGGAA CACCAGAA CTGGTC	40
YMMV_PNG_2.seq	CAAATGAAAGGCAGCAGCTT TACGGAA CACCAGAA CTGGTC	40
Consensus	caaatgaa gcagcagc ta ggaa accagaa tcg c	
Ymmv_guard_3.seq	TTTTGGTCTAGACGGTTCTGTGAGCAACAGGAAAA	80
YMMV_togo_1.seq	TTTTGGTCTAGACGGTTCTGTGAGCAACAGGAAAA	80
GPR4.seq	TTTTGGTCTAGATGGTTCTGTGAGCGGCAACAGGAAAA	80
GPR3.seq	TTTTGGCCTAGATGGTTCTGTGAGCAACAGGAAAA	80
YMMV_mart1.seq	TTTTGGTCTAGATGGTTCTGTGAGCAACAGGAAAA	80
YMMV_JPN_3.seq	TTTTGGTCTAGATGGTTCTGTGAGCAACAGGAAAA	80
YMMV_PNG_2.seq	TTTTGGTCTAGATGGTTCTGTGAGCAACAGGAAAA	80
Consensus	tttt gg t ga ggttctgtcagc aa ga ga aa	
Ymmv_guard_3.seq	CACAGAAAGGCACACAAGCGATGATGTGAGCAAAGGACATG	120
YMMV_togo_1.seq	CACAGAAAGGCACACAAGCGATGATGTGAGCAAAGGACATG	120
GPR4.seq	CACAGAAAGGCACACAAGCGATGATGTGAGCAAAGGACATG	120
GPR3.seq	CACAGAAAGGCACACAAGCGATGATGTGAGCAAAGGACATG	120
YMMV_mart1.seq	CACAGAAAGGCACACAAGCGATGATGTGAGCAAAGGACATG	120
YMMV_JPN_3.seq	CACAGAAAGGCACACAAGCGATGATGTGAGCAAAGGACATG	120
YMMV_PNG_2.seq	CACAGAAAGGCACACAAGCGATGATGTGAGCAAAGGACATG	120
Consensus	cac ga g cacacaag ga ga gtgagcaa gacatg	
Ymmv_guard_3.seq	CACTCTTTCTGGAGTGCGCAATATCT	148
YMMV_togo_1.seq	CACTCTTTCTGGAGTGCGCAATATCT	148
GPR4.seq	CACTCTTTCTGGAGTGCGCAATATCT	148
GPR3.seq	CACTCTTTCTGGAGTGCGCAATATCT	148
YMMV_mart1.seq	CACTCTTTCTGGAGTGCGCAATATCT	148
YMMV_JPN_3.seq	CACTCTTTCTGGAGTGCGCAATATCT	148
YMMV_PNG_2.seq	CACTCTTTCTGGAGTGCGCAATATCT	148
Consensus	cactcttctt ggagtgcg aatatct	

Fig 6 e 7.



LEGENDA

Tabela 1. Amostras de inhame de diferentes áreas produtoras analisadas pelos testes DAC-ELISA e TAS-ELISA

FIG 1. Folha de inhame e partículas virais. A- Partículas observadas em preparações “leaf dip” em amostra da cv. Inhame-da-Costa; B- Sintomas de mosaico na cv. São Tomé.

FIG 2. Sintomas em planta de inhame e túberas coletadas de plantas marcadas em campo. A- Sem sintomas (fita branca); B- Pouco sintoma (fita azul); C- Sintomas severos (fita amarela); D – F- Túberas colhidas de plantas marcadas.

FIG 3. Gel de agarose com produtos de RT-PCR e PCR. **Géis A e B- M=** Indicação de peso molecular (Marcador); **ala=** *Dioscorea alata* e **rot.=** *Dioscorea rotundata*, controles fornecidos pelo CIRAD; **2;4;5;6 e 7=** Amostras. **rot.=** *Dioscorea rotundata*; **ala=** *Dioscorea alata*; **m=** *Yam mosaic virus* (YMV); **mm=** *Yam mild mosaic virus* (YMMV) **b=** Badnavirus; **PE=** Pernambuco; **PB=** Paraíba.

FIG 4. Alinhamento múltiplo entre as seqüências dos isolados QUI e BON (YMV) e outros isolados de YMV disponíveis no GenBank. Os nucleotídeos marcados com a cor preta significam alta similaridade entre as seqüências; nucleotídeos marcados com a cor rosa significam similaridade intermediária entre as seqüências; nucleotídeos marcados com a cor azul significam baixa similaridade entre as seqüências e nucleotídeos não significam que são diferentes dos demais

FIG 5. Alinhamento múltiplo entre as seqüências dos isolados SJM e CND (YMMV) e outros isolados de YMMV disponíveis no GenBank. Os nucleotídeos marcados com a cor preta significam alta similaridade entre as seqüências; nucleotídeos marcados com a cor rosa significam similaridade intermediária entre as seqüências; nucleotídeos marcados com a cor azul significam baixa similaridade entre as seqüências e nucleotídeos não marcados significa que são diferentes dos demais.

FIG 6. Árvore filogenética preparada a partir das seqüências de nucleotídeos referente a região C terminal da proteína capsial de isolados de potyvírus causadores do *Yam mosaic virus* e *Yam mild mosaic virus*. O comprimento dos ramos horizontais é proporcional à distância genética entre os isolados; os ramos verticais são arbitrários. Os números sobre os ramos indicam a porcentagem de repetições da análise de *bootstrap* na qual as ramificações foram observadas.

FIG 7. Árvore filogenética preparada a partir das seqüências de nucleotídeos referente a região C terminal da proteína capsial de isolados de badnavírus causadores do *Dioscorea alata baciliform virus* (DaBV). O comprimento dos ramos horizontais é proporcional à distância genética entre os isolados; os ramos verticais são arbitrários. Os números sobre os ramos indicam a porcentagem de repetições da análise de *bootstrap* na qual as ramificações foram observadas.

CONCLUSÕES GERAIS

CONCLUSÕES GERAIS

- A cultura do inhame (*Dioscorea* spp.) no Nordeste brasileiro apresenta importantes pragas e doenças nas regiões produtoras pesquisadas.
- No campo, destacam-se, a lagarta da folhagem (*Pseudoplusia* oo), Pinta Preta (*Curvularia eragrostidis*); Casca Preta (*Scutellonema bradys* e *Pratylenchus coffea*), Meloidoginose (*Meloidogyne* spp.) e viroses (*Yam mosaic virus*, *Yam mild mosaic virus* e badnavírus);
- A lagarta da folhagem, presente em todas as áreas é mais prevalente em *D. alata*, Inhame São Tomé;
- Pinta Preta, registrada em todos os campos é predominante em *D. rotundata*, Inhame-da-Costa;
- Casca Preta, observada na maioria dos campos apresenta maior intensidade em *D. rotundata*, causada por *Pratylenchus coffea*;
- Meloidoginose, detectada na maioria das áreas produtoras, mostra baixa intensidade, sendo mais frequente em *D. rotundata*;

- As viroses, presentes em praticamente todos os campos possui maior frequência e intensidade em *D. rotundata*;
- Em túberas-sementes armazenadas, além do agravamento dos danos de Casca Preta, predominam cochonilha (*Planococcus* sp.), broca das túberas (*Araecerus fasciculatus*) e Podridão Verde (*Penicillium sclerotigenum*) ;
- Todas as pragas e doenças de armazenamento desenvolveram-se em material de todas as áreas pesquisadas, sendo que a Podridão Verde preeminou em *D. rotundata*;
- Ficou comprovado que as túberas-semente são veículos importantes para sobrevivência, disseminação e acúmulo das três espécies virais estudadas.