

**JOYCE SILVA LIMA**

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE VÍRUS QUE INFECTAM O INHAME  
(*Dioscorea* spp.) NO NORDESTE DO BRASIL**

**RECIFE-PE, BRASIL**

**FEVEREIRO, 2012**

**JOYCE SILVA LIMA**

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE VÍRUS QUE INFECTAM O INHAME  
(*Dioscorea spp.*) NO 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 título de Doutor em Fitopatologia.

**COMITÊ DE ORIENTAÇÃO:**

Orientador: Gaus Silvestre de Andrade Lima

Co-Orientador: Francisco Murilo Zerbini

**RECIFE-PE, BRASIL**

**FEVEREIRO, 2012**

Ficha Catalográfica

L732c Lima, Joyce Silva  
Caracterização molecular de vírus que infectam inhame  
(*Dioscorea* spp.) no nordeste do Brasil / Joyce Silva Lima. –  
Recife, 2012.  
86 f. : il.

Orientador (a): Gaus Silvestre de Andrade Lima.  
Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Universidade  
Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Agronomia,  
Recife, 2012.

Referência.

1. *Dioscorea cayenensis* 2. Diversidade 3. Badnavírus  
4. Geminivírus I. Lima, Gaus Silvestre de Andrade, Orientador  
II. Título

CDD 632

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE VÍRUS QUE INFECTAM O INHAME  
(*Dioscorea spp.*) NO NORDESTE DO BRASIL**

**JOYCE SILVA LIMA**

Tese defendida e aprovada pela Banca Examinadora em: 17/02/2012

**ORIENTADOR:**

---

Prof. Dr. Gaus Silvestre de Andrade Lima

**EXAMINADORES:**

---

Prof. Dr. Gilvan Pio Ribeiro

---

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Maria de Fátima Silva Muniz

---

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Iraíldes Pereira Assunção

---

Dr<sup>ª</sup>. Sarah Jacqueline Cavalcanti da Silva

**RECIFE – PE, BRASIL**

**FEVEREIRO, 2012**

*A minha mãe Josefa, meu irmão Cleuson, meus avós José e Eraclides e a toda minha família, pelo amor incondicional, incentivo e compreensão*

**DEDICO**

## **AGRADECIMENTOS**

*A Deus por me fazer forte e paciente em cada momento de dificuldade, pois a fé foi meu guia a cada passo;*

*À Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), à Universidade Federal de Alagoas (UFAL) e à Universidade Federal de Viçosa (UFV) pelo apoio institucional;*

*À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), à Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Alagoas (FAPEAL), à Fundação de Amparo à ciência e Tecnologia o Estado de Pernambuco (FACEPE) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pela concessão da bolsa de estudo e pelos auxílios concedidos;*

*Ao Professor Gaus Silvestre de Andrade Lima, a quem tenho grande admiração e respeito, pela orientação, confiança, amizade e ensinamentos passados durante toda minha vida acadêmica. (serei sempre grata);*

*Às professoras Iraíldes Pereira Assunção e Maria de Fátima Silva Muniz, pelo apoio e disposição em me ensinar e ajudar sempre que necessitei;*

*Ao Prof<sup>o</sup>. Francisco Murilo Zerbini e à Dra. Poliane Alfenas Zerbini por todos os ensinamentos e confiança a mim transmitidos;*

*A todos os Professores da UFRPE pelos ensinamentos ao longo do curso de doutorado;*

*A todos os amigos da turma da Pós-Graduação em Fitopatologia da UFRPE pela agradável convivência durante o curso;*

*Aos meus amigos do Laboratório de Fitopatologia Molecular da UFAL, Aline, Antônio, Edlene, Helloá, Liliane, Mayra e Wellington, e em especial para Arthur, Érika, Mariote, Sarah e Sheila;*

*Aos meus amigos do Laboratório de Virologia Vegetal Molecular da UFV Ana, Adriana, Álvaro, Amanda, César, Danielle, Fernanda, Larissa, Lenin, Joaquim, Jorge, Marcelo, Márcio, Mercedes, Marcos, Pedro, Sílvia, em especial a André, Alison, Carolina, Fábio, Gisele, Glória, Renan, Roberto, Sarah e Tathiana;*

*Aos amigos de Viçosa-MG, Ana Carolina, Anderson, André Luíz, Diana, Diêgo, Gislane, Hugo, Julliany, Lara e Pricila, pela convivência divertida e agradável, aprendi muito com vocês;*

*Aos meus amigos de sempre e para sempre, Allan, Clívia, Dieges, Erika, Isadora, Ivy, Kátia, Kamila, Kirley, Marília, Maryanne e Velber por terem entendido minha ausência e por acreditarem na nossa amizade;*

*A todos aqueles que de alguma forma contribuíram para realização deste trabalho.*

## SUMÁRIO

SUMÁRIO.....	vi
RESUMO GERAL.....	vii
GENERAL ABSTRACT.....	viii
CAPÍTULO I – INTRODUÇÃO GERAL.....	01
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	15
CAPÍTULO II – Diversidade de sequências entre isolados de badnavírus infectando inhame ( <i>Dioscorea</i> spp.) no Nordeste brasileiro.....	28
Resumo.....	30
Abstract.....	30
Introdução.....	31
Materiais e Métodos.....	32
Resultados.....	34
Discussão.....	35
Referências.....	38
CAPÍTULO III – Infecção de plantas de inhame ( <i>Dioscorea</i> spp.) por geminivírus no Brasil.....	57
Resumo.....	59
Abstract.....	59
Introdução.....	60
Materiais e Métodos.....	63
Resultados.....	64
Discussão.....	65
Referências.....	69
CONCLUSÕES GERAIS.....	95

## RESUMO GERAL

A cultura do inhame (*Dioscorea* spp.) apresenta grande importância socioeconômica para a região Nordeste do Brasil, devido à excelente qualidade nutritiva e energética de suas túberas, apresentando potencial de expansão via exportação de túberas, especialmente para a Europa. Patógenos virais estão entre os principais fatores que ameaçam a produção e produtividade de inhame e circulação segura de germoplasma, contudo informações sobre a ocorrência e distribuição de vírus de inhame são limitadas no Brasil. Neste estudo, as pesquisas foram conduzidas para detectar a ocorrência de viroses nas zonas produtoras do Nordeste do Brasil. A análise de um total de 425 amostras de folhas de inhame obtidas em áreas de cultivo, localizadas nos estados de Alagoas, Pernambuco e Paraíba foram avaliadas através das técnicas moleculares de reação em cadeia da polimerase (PCR) e amplificação em círculo rolante (RCA) que revelaram a ocorrência de badnavírus e geminivírus. Analisando a sequência parcial de nucleotídeos da região codificante RT/RNaseH observou-se que os isolados de badnavirus correspondem à espécie *Dioscorea alata bacilliforme virus* (DaBV) e apresentam identidade de seqüências de nucleotídeos de 50 isolados de DaBV variando entre 78-97%. Constatou-se ainda um grupo de quatro isolados que não se relacionaram com nenhuma espécie do gênero *Badnavirus*, podendo constituir um novo gênero de fitovírus ou corresponder a seqüências endógenas integradas. Em algumas amostras foi constatada a presença de um novo begomovirus estreitamente relacionado com espécies que infectam tomate e plantas daninhas. Um curtovirus também foi detectado nas amostras de inhame e relacionado com uma espécie já descrita *Beet mild curly top virus*, ainda não relatada no Brasil em nenhum hospedeiro. Estes resultados sugerem a ampla disseminação do DaBV no Nordeste brasileiro e a possível presença de seqüências endógenas em plantas de inhame e registra o primeiro relato de geminivírus na cultura do inhame e em monocotiledôneas em geral no Brasil.

**Palavras-chave:** *Dioscorea alata bacilliforme virus*, diversidade, geminivírus, RCA



## GENERAL ABSTRACT

The yam crop (*Dioscorea* spp.) has a great socioeconomic importance for the Northeast region of Brazil, due to the excellent nutritional quality and energy of its tubers, with potential for export, especially for Europe. However information about the occurrence and distribution of yam viruses are limited in Brazil, the major constraints to yam production, are the viral pathogens. In this study, surveys were conducted to detect the occurrence of viruses yam in productive areas in northeastern Brazil. The analysis of sequences of virus in yam leaf samples from Alagoas, Pernambuco and Paraíba states were evaluated using the molecular techniques polymerase chain reaction (PCR) and rolling circle amplification (RCA) which revealed the occurrence of badnavirus and geminivirus. Analyzing the partial nucleotide sequence in the RT/RNaseH encoding region, was observed that the isolates of badnavirus correspond to the species *Dioscorea alata bacilliform virus* (DaBV) and presented nucleotide sequences identity with 50 isolates of DaBV varying between 78-97%. It was also observed that a group with four isolates unrelated to any species of *Badnavirus* genus, indicating the possibility of being a new phytovirus genus or corresponding to endogenous sequence. Some samples showed the presence of a new begomovirus closely related to species that infect tomato and weeds. A curtovirus was also detected in yam samples and it was related to the described specie *Beet mild curly top virus*, not reported in Brazil in any host. These results suggest that DaBV is a widespread virus found in northeastern Brazil, the possible presence of endogenous sequences in yam and records the first report of geminivirus in yam and monocotyledonous in Brazil.

**keywords:** *Dioscorea alata bacilliforme virus*, diversity, geminivirus, RCA

---

**Introdução geral**

## CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE VÍRUS QUE INFECTAM O INHAME (*Dioscorea* spp.) NO NORDESTE DO BRASIL

### INTRODUÇÃO GERAL

#### A cultura do Inhame: classificação, origem e importância econômica

O inhame é uma angiosperma monocotiledônea pertencente à ordem Liliiflorae, família Dioscoreaceae, gênero *Dioscorea*. É considerada a mais primitiva das angiospermas e contém cerca de 600 espécies, das quais somente dez são consideradas como comestíveis (O'HAIR, 1990). As espécies cultivadas incluem *Dioscorea alata* L., *D. cayenensis* Lam., *D. rotundata* Poir., *D. esculenta* Lour Burk, *D. bulbifera* L., *D. nummularia* Lam., *D. pentaphylla* L., *D. hispida* Dennst., *D. trifida* L. e *D. dumetorum* Pax. O inhame consiste de um complexo de espécies originado principalmente da África e Ásia antes da dispersão para as outras regiões do mundo (HAHN et al., 1987).

Evidências indicam que diferentes espécies de *Dioscorea* originaram-se em três áreas independentes dos trópicos: Ásia, África Ocidental e América tropical. *D. alata* e *D. esculenta* originaram-se da Ásia e foram introduzidas na África Ocidental, *D. rotundata*, *D. cayenensis* e *D. dumetorum* são oriundas da África Ocidental e estão entre as poucas plantas domesticadas verdadeiramente do Oeste Africano e *D. trifida* originou-se na América tropical (COURSEY, 1967; AYENSU; COURSEY, 1972; HAHN et al., 1987). Em geral, houve um movimento para o leste de espécies de inhame durante o processo de domesticação da cultura (HAHN et al., 1987).

A África Ocidental é a zona dominante de produção do inhame, onde cerca de 48 milhões de toneladas (93% da produção mundial) são produzidas em quatro milhões de hectares anualmente, principalmente, em Benin, Costa do Marfim, Gana, Nigéria e Togo (ASIEDU, 2010). O Brasil é o maior produtor dessa cultura na América do Sul, com uma área colhida de 27 mil ha e produção de 250 mil toneladas (FAO, 2011). De acordo com o censo agropecuário, a região Nordeste foi responsável pela produção de 38.256 toneladas de inhame, tendo os Estados de Pernambuco, Paraíba e Alagoas contribuído respectivamente com 16.574, 8.441 e 2.872 toneladas (IBGE, 2006). A cultura do inhame apresenta grande importância socioeconômica para a região Nordeste do Brasil, sobretudo para os Estados da Paraíba, Pernambuco, Alagoas, Bahia e Maranhão, por constituir negócio agrícola promissor. As túberas são altamente energéticas e ricas em vitaminas do complexo B (tiamina,

riboflavina, niacina e piridoxina), carboidratos, amido e minerais, apresentam baixo teor de gorduras, sendo ainda estimulante do apetite. Algumas espécies vêm sendo utilizadas para extração de sapogeninas esteroidais e de material de partida para a síntese de cortisona (SANTOS, 2002). Grande parte da produção de inhame é destinada ao mercado interno e a outra parte é exportada, principalmente para a Europa (SANTOS, 2002).

O inhame constitui opção agrícola de grande potencial para ampliar o consumo no mercado interno e atender a demanda do mercado externo. Associado a isso, está o crescimento das exportações do produto, o que aumenta as expectativas e o interesse dos agricultores no cultivo dessa hortaliça, principalmente em função dos melhores preços oferecidos pelos exportadores. No entanto, para que haja retorno econômico da atividade, faz-se necessário estruturar a cadeia produtiva, promover melhoria dos sistemas de produção, da qualidade do produto, oferta constante e preços competidores, fatores estes que estão associados aos conhecimentos técnicos e tecnologias disponíveis para a condução adequada da cultura (SANTOS, 2002).

O inhame é propagado por túberas-semente ou seções da túbera, pois o uso de sementes verdadeiras como propágulos é restrita a estações de pesquisa, principalmente em programas de melhoramento da cultura (ASIEDU, 2010). Os agricultores obtêm as túberas-semente pela seleção de túberas pequenas (300 a 500 g) de cada colheita (muitas vezes estas são aquelas produzidas por plantas doentes), usando túberas da segunda colheita de maturação precoce, que produzem múltiplas túberas, ou pelo corte da túbera em pedaços (AIGHEWI et al., 2003).

No mercado brasileiro têm destaque duas cultivares de inhame: Da Costa (*D. cayennensis*), única exportada, e São Tomé (*D. alata*), menos cultivada na região Nordeste, onde a cultivar Da Costa é a mais plantada, produzindo túberas com elevado valor econômico (MOURA, 2005). Apesar da importância sócio-econômica que essa cultura representa para a região Nordeste do Brasil, sua produtividade ainda continua baixa, decorrente do manejo inadequado da cultura, do uso de túberas-semente de inferior qualidade agrônômica, em função da indisponibilidade de material de melhor qualidade (O'HAIR, 1990).

O inhame é afetado por uma variedade de pragas e doenças nas fases de pré e pós-colheita. Doenças e pragas de inhame foram relatadas na maioria das áreas de plantio e constituem um dos principais entraves para a produção, armazenamento e exportação (MANTELL, 1993).

As viroses são de particular importância porque como a floração e emissão de sementes são raras, comercialmente o inhame é propagado vegetativamente por meio de pequenas túberas ou pedaços de túberas, resultando no acúmulo e perpetuação dos vírus (KENYON et al., 2001; SEAL; MULLER, 2007). Como consequência do acúmulo de vírus no material propagativo, as plantas perdem o vigor e produzem túberas de qualidade reduzida (AMUSA et al., 2003). A propagação vegetativa, através de túberas-sementes, facilita a sobrevivência, disseminação e o acúmulo de agentes virais em cultivos sucessivos.

### **Vírus em *Dioscorea* spp.**

Doenças virais de inhame foram inicialmente identificadas em Serra Leoa e em Porto Rico em 1936 (COOK, 1978). Descrições subsequentes de infecção por vírus de inhame foram em 1957 (MIEGE, 1957) e em 1961 (ROBERTSON, 1961). Sintomas de mosaico moderado a grave foram posteriormente relatados em *D. rotundata* na Nigéria (TERRY, 1976). Vírus têm sido relatados infectando diferentes espécies de inhame em todas as regiões em que a cultura foi estabelecida (THOUVENEL; FAUQUET, 1979; GOUDOU-URBINO et al., 1996; HUGHES, 1997; ALEMAN-VERDAGUER et al., 1997; PHILLIPS et al., 1999; ODU et al., 2004; SEAL; MULLER, 2007). Tais vírus até então estão distribuídos nos gêneros: *Potyvirus*, *Badnavirus*, *Potexvirus*, *Maculavirus*, *Comovirus* e *Cucumovirus* (LEBOT, 2009).

Os sintomas associados a doenças causadas por vírus variam dependendo do agente envolvido, mas em geral incluem: clorose foliar severa, mosaico, cordão-de-sapato, clorose internerval, nanismo, distorção foliar, dentre outros. Estes sintomas, que afetam principalmente a folhagem, levam a uma redução na capacidade fotossintética da planta infectada com efeitos deletérios sobre a produção, qualidade das túberas e em algumas situações causam a morte das plantas (THOUVENEL; DUMONT, 1988). Além de um vírus isolado, podem ocorrer também infecções mistas de vírus, o que complica a identificação da espécie viral e acentua os sintomas da doença e as perdas na produção.

Infecções mistas de diferentes isolados de uma mesma espécie viral ou de vírus pertencentes a espécies distintas foram relatadas em várias espécies de *Dioscorea*. Por exemplo, *Yam mosaic virus* (YMV, gênero *Potyvirus*) e *Yam mild mosaic virus* (YMMV, gênero *Potyvirus*) em *D. dumetorum* e em *D. alata* na Nigéria (HUGHES, 1997). No Caribe, um potyvírus foi observado em combinação com o *Dioscorea bacilliforme virus* (DBV, gênero

*Badnavirus*) em *D. alata* e *D. cayenensis* (MOHAMED; MANTELL, 1976). Também são relatados que ocorrem frequentemente infecções mistas envolvendo *Cucumber mosaic virus* (CMV, gênero *Cucumovirus*) com badnavírus e potyvírus (MIGLIORI; CADILHAC, 1976).

Existem ainda relatos de vírus não classificados infectando várias espécies de inhame. Devido ao fato de as investigações não serem conclusivas, seus status permanecem definidos como espécies separadas ou estirpes. Alguns destes vírus incluem o vírus da mancha marrom do inhame, um possível membro do gênero *Badnavirus* que foi detectado pela primeira vez em *D. alata* em Barbados por Coursey (1967), o qual provoca manchas marrons nos tubérculos de plantas infectadas. *Dioscorea mottle virus* (DMoV), um possível membro do gênero *Comovirus*, e *Dioscorea dumetorum virus* (DDV) que pode ser um membro do gênero *Potyvirus*, foram relatados na Nigéria por Hughes (1997).

Outros incluem *Dioscorea latent virus* (DLV), um provável potexvírus relatado em *D. composita* e *D. floribunda* em Porto Rico (WATERWORTH et al., 1974; PHILLIPS et al., 1999). O Chinese yam necrotic mosaic virus (ChYNMV), uma partícula filamentosa de aproximadamente de 12-13 x 660 nm, observada em *D. batatas* (inhame japonês) no Japão, onde encontrava-se amplamente disseminado (FUKUMOTO; TOCHIHARA, 1978) e *Dioscorea trifida virus* (DTV) relatado pela primeira vez em *D. trifida* com sintomas de mosaico e deformação foliar em Gaudalupe (MIGLIORI; CADILHAC, 1976). Ainda de acordo com esses autores o vírus é transmitido de forma não persistente, por pulgão- *Aphis gossypii* Glover, 1877 (Hemiptera: Aphididae) e também por inoculação mecânica.

Em *D. alata* o *Dioscorea alata bacilliform virus* (DaBV) causa distorção foliar severa e é descrito como sendo amplamente distribuído nas áreas produtoras (PHILLIPS et al., 1999; BRIDDON, 1999).

As sequências completas de nucleotídeos de um isolado nigeriano de DaBV e um isolado de um vírus baciliforme de *D. sansibarensis* do Benin (*Dioscorea sansibarensis* Baciliform virus – DsBV), foram analisadas inicialmente por Briddon et al. (1999) e posteriormente por Seal e Muller (2007). O tamanho dos genomas desses vírus mostraram ser de aproximadamente 7.4 kb and 7.26 kb, respectivamente, com 61.9 % de identidade.

Adicionalmente, estudos revelaram que sequências virais podem ocorrer dispersas no genoma de plantas, originárias de uma infecção viral anterior que se fixou na linhagem germinativa (GAYRAL; ISKRA-CARUANA, 2009). O mecanismo desta integração ainda é desconhecido, visto que nenhum fitovírus descrito até agora exige um passo de integração como parte de sua replicação (STAGINNUS; RICHERT-PÖGGELER, 2006). Tais sequências são conhecidas como sequências endógenas de pararetrovírus (Endogenous

Pararetroviral Sequences - EPRVs) e são a classe mais abundante de sequências virais endógenas em diferentes espécies de plantas (GAYRAL; ISKRA-CARUANA, 2009). Estas foram encontradas no genoma nuclear de espécies de famílias distantes, como *Rutaceae*, *Solanaceae* (batata, petúnia, tabaco), *Poaceae* (arroz), *Musaceae* (banana) (STAGINNUS; RICHERT-PÖGGELER, 2006), e mais recentemente nas famílias *Agavaceae* (*Drascena sanderiana*) (SU et al., 2007), *Asteraceae* (*Dahlia variabilis*) (PAHALAVATTA; PAPPU, 2008) e *Dioscoreaceae* (*Dioscorea* spp.) (BOUSALEM et al., 2009).

Todas as EPRVs descritas até o momento possuem um padrão de arranjo similar com repetições em tandem, duplicações internas, fragmentações e inversão do genoma viral. A maioria das EPRVs resulta em genomas virais parciais e não funcionais, porém várias integrações contêm toda extensão do genoma viral, com sequências de leitura aberta (ORFs) funcionais. Tais sequências podem então ser ativadas resultando na liberação do genoma viral funcional que infectará o hospedeiro (GAYRAL; ISKRA-CARUANA, 2009). EPRVs que podem causar infecção já foram descritas para o *Petunia vein clearing virus* (PVCV) em petúnia (*Petunia hybrida*) (RICHERT-POGGELER; SHEPERD, 1997), para o *Tobacco vein clearing virus* (TVCV) em *Nicotiana edwardsonii* (LOCKHART et al., 2000) e para o *Banana streak virus* (BSV) em banana (DALLOT et al., 2001; NDOWORA et al., 1999).

### **Família *Potyviridae***

Os vírus de inhame mais completamente caracterizados são os potyvírus, são também relatados como sendo os mais amplamente distribuídos (HUGHES et al., 1997; BRUNT et al., 1996; KENYON et al., 2001).

A família *Potyviridae* contém os gêneros *Potyvirus*, *Bymovirus*, *Rymovirus*, *Macluravirus*, *Ipomovirus* e *Tritimovirus* (THOUVENEL; FAUQUET, 1979). A transmissão do vírus ocorre geralmente por afídeos de uma forma não-persistente, apesar de alguns vírus serem transmitidos também ácaros ou moscas brancas (SHUKLA et al, 1989, THOUVENEL; FAUQUET, 1979; ODU et al., 2004). A família pode ser dividida em subgrupos de acordo com o tipo de corpos de inclusão que induzem e do tipo de vetor específico. Um estudo recente sobre a genética da variabilidade de isolados de *Yam mosaic virus* (YMV) tem mostrado a presença de uma mutação levando à perda de sua transmissibilidade, este achado sugere fortemente que este isolado pode espalhar-se apenas por propagação vegetativa (BOUSALEM et al., 2000).

O gênero *Potyvirus*, o nomeado a partir de seu membro tipo, *Potato virus Y* (PVY), é de longe o maior dos 34 diferentes grupos ou famílias de vírus de plantas. Os potivírus infectam uma ampla gama de hospedeiras na maioria das regiões climáticas (THOUVENEL; FAUQUET, 1979).

As partículas virais de potivírus são não-envelopadas, flexuosas e de forma cilíndrica, relatado com 680-900 nm de comprimento e 11-15 nm de largura. O genoma é de uma única fita de RNA (+ ss) sentido positivo de cerca de 10.000 nucleótidos e tem uma única ORF. A extremidade 3' contém uma região poliadenilada (poli A) de comprimento variável. O RNA genômico codifica uma única poliproteína. Esta, em seguida, é submetida a um co-processamento proteolítico e pós-translacional por três proteínas virais codificadas de produtos gênicos individuais, para se obter dez produtos protéicos. As funções das proteínas dos potivírus têm sido extensivamente estudadas (ALEMAN-VERDAGUER et al., 1997) e são:

P1: De todas as proteínas potyvírid, P1 é a menos conservada em seqüência e mais variável em tamanho. Ela desempenha um papel significativo na replicação do vírus, provavelmente devido à estimulação do gene silenciando supressor de HC-Pro.

HC-Pro (Helper Componente Protease-): a proteína HC-Pro tem papéis em supressão de gene silenciamento e na transmissão vetorial. Um domínio de protease de cisteína para o C-terminal clivá-lo do resto da poliproteína a jusante, tipicamente a Gly-Gly.

P3: Envolvido em replicação viral e parece ser significativo na gama de hospedeiros e sintoma desenvolvimento.

6K1: A função desta pequena proteína não é conhecida.

CI (proteína de Inclusão cilíndrica): Esta proteína tem atividade helicase e se acumula como inclusões no citoplasma de células de plantas infectadas.

6K2: uma proteína transmembranar pequena provavelmente ancorando o complexo de replicação para o retículo endoplasmático.

VPG (proteína viral ligada ao genoma): Ligada ao terminal 5' do genoma e pertence à uma classe de proteínas intrinsecamente desordenados. Ela desempenha várias funções no ciclo de infecção viral. Ela é essencial para a replicação do vírus e da tradução, interagindo com um ou várias isoformas do fator de iniciação da tradução e está envolvido ainda na supressão de silenciamento de RNA.

NIA-Pro: protease de cisteína responsável pela clivagem da maioria dos sítios da poliproteína, tipicamente a Gln/Glu- (Ser / Gly / Ala).

NIB: A RNA polimerase dependente de RNA.



CP: capa protéica viral que também tem papéis no movimento do vírus, amplificação do genoma e transmissão pelo vetor (ALEMAN-VERDAGUER et al., 1997).

### **Família *Caulimoviridae***

A família *Caulimoviridae* engloba os vírus os quais as partículas não são envelopadas e podem ser de morfologia isométrica ou baciliforme. Possuem aproximadamente 35-50 nm de diâmetro e 900nm de comprimento (para os baciliformes) ou 45-50 nm de diâmetro e simetria icosaédrica (para os isométricos). O genoma dos caulimovírus é uma molécula de DNA semicircular de fita dupla com cerca de 6-8 kb (FAUQUET et al., 2005). O genoma de caulimovírus possui uma região intergênica poli (A) a qual pode também estar ausente, e descontinuidades de fita simples ou gaps em sítios específicos de ambas as fitas (HARPER et al., 2002).

Os hospedeiros naturais de espécies da família *Caulimoviridae* são Angiospermas das classes Dicotyledonae e Monocotyledonae. Dependendo do gênero, a transmissão natural do vírus pode ocorrer via inseto vetor (insetos das famílias Aleyrodidae, Aphididae, Cicadellidae e Pseudococcidae: ordem Hemiptera) ou por contato entre plantas hospedeiras, bem como por sementes ou pelo pólen. A transmissão pode ser também realizada por técnicas como a inoculação mecânica e enxertia (FAUQUET et al., 2005). Os sintomas característicos na planta associados aos caulimovírus compreendem: clareamento de nervuras, estrias, mosaico, manchas necróticas, linhas e manchas cloróticas, nanismo, enrolamento da folha, má formação foliar e enrolamento de folíolos.

De acordo com o Comitê Internacional de Taxonomia Viral (ICTV) (KING et al., 2011), a família *Caulimoviridae* pode ser taxonomicamente dividida em seis gêneros: *Caulimovirus*, *Soymovirus*, *Cavemovirus*, *Tungrovirus*, *Badnavirus* e *Petuvirus*.

A replicação dos caulimovírus, em geral, envolve duas fases: transcrição de RNA a partir do DNA viral no núcleo e transcrição reversa deste RNA para gerar dsDNA no citoplasma. O genoma desses vírus também contém uma sequência complementar ao tRNAMet da planta que corresponde ao sítio de iniciação da replicação do DNA. Geralmente este sítio está localizado dentro ou adjacente à região intergênica (região não-codificante) e é geralmente designada como nucleotídeo 1 (DE KOCHKO et al., 1998). Em contraste com os retrovírus, os pararetrovírus vegetais não necessitam de integração ao genoma hospedeiro para sua replicação, portanto seu genoma não codifica a proteína integrase. Contudo certas espécies de caulimovírus são denominados Pararetrovirus Endógenos (STAGINNUS et al.

2006) mostram um domínio integrase putativo semelhante aos encontrados em retrovírus e retrotransposons da família Ty3/Gypsy (RICHERT-PÖGGELER; SHEPERD, 1997). Três vírus em particular, *Banana streak virus* (BSV), PVCV e *Tobacco vein clearing virus* (TVCV) tem demonstrado infecções episomais associadas com sequências integradas (HARPER, 2002).

Os membros da família *Caulimoviridae* são classificados como "Pararetrovirus", termo introduzido por Temin (1985) para definir vírus de plantas que diferem dos retrovírus com base no seu genoma de DNA e na sua integração irregular dentro do genoma hospedeiro para a replicação. Sabe-se até então que as sequências genômicas de alguns pararetrovirus vegetais, como PVCV (RICHERT-PÖGGELER; SHEPERD, 1997) e *Banana Streak virus* (BSV) (NDOWORA et al., 1999; HARPER et al., 2005), são integradas no genoma hospedeiro, e que podem dar origem a vírus episomais (NDOWORA et al., 1999). Assume-se geralmente que as sequências integradas são provenientes de eventos de infecções antigas (HARPER et al., 2005) ou sequências representativas intermediárias entre caulimovírus e retrotransposons LTR (BOUSALEM et al., 2008; LLORENS et al., 2009).

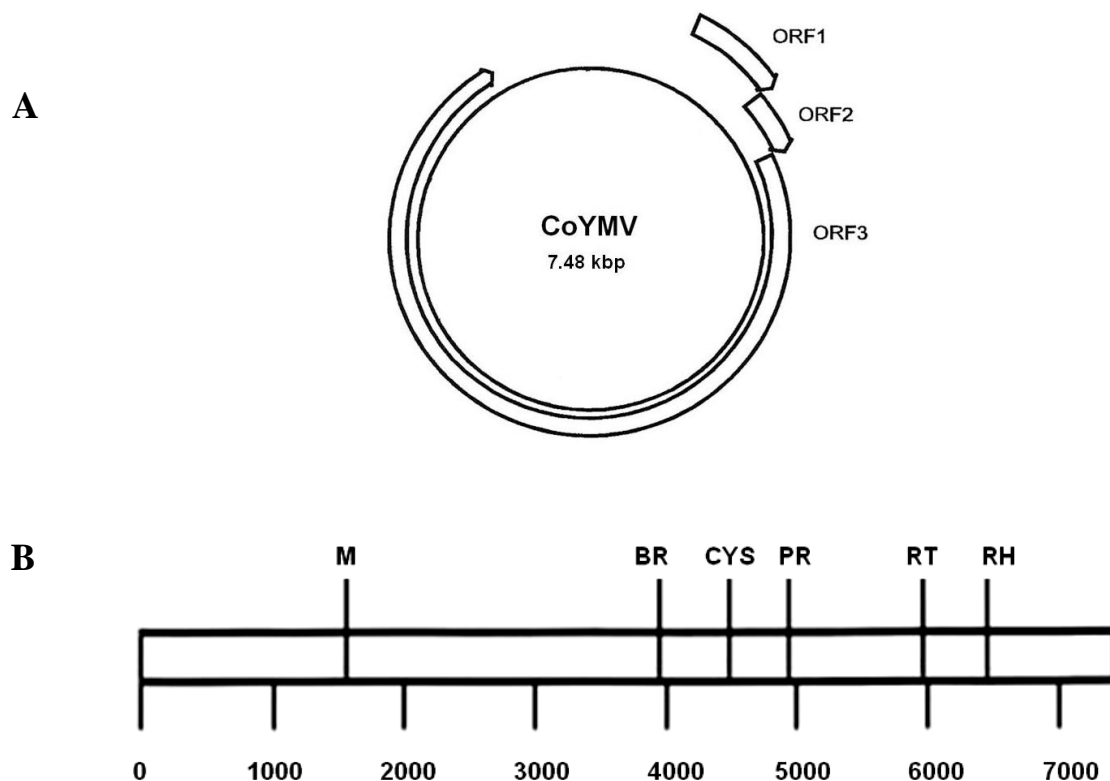
### **Gênero *Badnavirus***

O mais numeroso gênero da família *Caulimoviridae* é *Badnavirus*, cujos membros se apresentam como vírions baciliformes com 95-130 nm de comprimento e 24-35 nm de largura (FAUQUET et al., 2005). O genoma de badnavírus geralmente contém uma única molécula de dsDNA de cerca de 7200-7600 pb que forma um círculo aberto interrompido por descontinuidades sítio-específicas e que podem conter uma região intergênica poli A (MEDBERRY et al., 1990). Os badnavírus são o segundo maior gênero de viroses de plantas conhecido que possui um genoma de DNA (BOUHIDA et al., 1993; HAGEN et al., 1993), com 18 espécies descritas e uma tentativa.

O genoma viral geralmente codifica para três ORFs (Figura 1A), mas em alguns casos podem estar presentes uma ou quatro ORFs adicionais, cujas funções ainda estão sendo estudadas. Todos os badnavírus contêm as três ORFs principais, e contêm geralmente três descontinuidades (gaps) em sítios específicos (BOUHIDA et al., 1993; HAGEN et al., 1993; HARPER; HULL, 1998).

As funções dos produtos das ORFs I e II permanecem desconhecidas. Contudo, a proteína da ORF I de *Comellina yellow motle virus* (CoYMV) está associada com vírions imaturos enquanto a ORF II é encontrada associada com ambos, imaturos e maduros

(CHENG et al., 1996). Os domínios funcionais da ORF III são o domínio rico em cisteína (CYS), motivo de ligação ao RNA (RB), aspartato protease (PR), e replicase viral (transcriptase reversa, RT e ribonuclease, RNase H-RH) (Figura 1B), os quais possuem domínios idênticos para os membros da família *Caulimoviridae* (MEDBERRY, 1990; LACO; BEACHY, 1994; HARPER; HULL, 1998).



**Figura 1.** A: Esquema da Organização genômica do *Commelina yellow mottle virus* (CoYMV) membro tipo do gênero *Badnavirus*. O círculo completo representa o genoma de DNA de fita dupla. As setas largas indicam a posição das ORFs 1, 2 e 3. B: Representação linear do mapa genômico de badnavírus mostrando a identificação dos domínios: domínios de movimento (M), motivo de ligação ao RNA (BR), região conservada de cisteína (CYS), aspartato protease (PR), transcriptase reversa (RT), Ribonuclease H (RH) (BRIDDON et al., 1999).

O membro tipo do gênero *Badnavirus* é o CoYMV, primeiramente relatado em *Commelina diffusa* Burm. f., em Guadalupe (MIGLIORI, 1978), onde suas propriedades foram descritas (LOCKHART, 1990, MEDBERRY et al., 1990).

Os badnavírus também tem sido relatados em várias espécies de plantas economicamente importantes, incluindo cacau (*Theobroma cacao* L.) (BRUNT, 1996), arroz (*Oryza sativa* L.) (OMURA et al., 1983), banana (*Musa* spp.) (LOCKHART; OLSZEWSKI, 1993; GAUHL et al., 1997; GEERING et al., 2000), cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.) (LOCKHART et al., 1988), *Kalanchoe* Adans. (HEARON; LOCKE, 1984), taro (*Colocasia esculenta* (L.) Schott.) (JAMES et al., 1973; YANG et al., 2003), inhame (*Dioscorea* spp. L.) (HARRISON; ROBERTS, 1973; PHILLIPS et al., 1999), citros (*Citrus* spp. L.) (AHLAWAT et al., 1996), espécies de pimenta (LOCKART et al., 1997) e recentemente uma espécie de groselha (JONES; McGAVIN, 2002), e pimenta-de-macaco. Membros do gênero *Badnavirus* são transmitidos principalmente pela cochonilha *Planococcus citri* (Risso, 1813) (Hemiptera: Pseudococcidae). Nem sempre são detectados em plantas sintomáticas e podem ser também detectados em plantas assintomáticas (GAUHL et al., 1997).

Os genomas de badnavirus têm sido relatados como sendo altamente variáveis, portanto, a maioria dos pares de primers para PCR utilizados para sua detecção foram desenhados a partir de três regiões conservadas que ocorrem na ORF III (MEDBERRY et al., 1990), representando o domínio tRNAMet e as regiões da RNase H e RT (LOCKHART; OLSZEWSKI, 1993; GEERING et al., 2000). Adicionalmente, para a alta variabilidade genética de badnavírus, a recente descoberta da integração de BSV no genoma da planta, acarreta em dificuldades de testes confiáveis de diagnóstico além de dificultar o intercâmbio internacional de germoplasma. A integração de partes do genoma de BSV em espécies de *Musa*, foi primeiramente apontado por (LAFLEUR et al., 1996) através de hibridização, e demonstrado adicionalmente por técnicas moleculares e citogenéticas por (HARPER et al., 1999). Geering et al. (2000) sugerem que sequências integradas de BSV podem estar ligadas ao genoma A ou B de *Musa* e que a distribuição dos integrantes de BSV podem estar restritos a determinadas espécies do hospedeiro, pois uma infecção em banana pode ser originada a partir de sequências integradas de badnavírus (NDOWORA et al., 1999). Cultura de tecidos e outros fatores de estresse podem também ativar algumas dessas sequências (DAHAL et al., 2000); (DALLOT et al., 2001).

Isolados de BSV da Nigéria e da Austrália demonstram uma significativa divergência de sequências, baseado na análise de hibridização do DNA (LOCKHART; OLSZEWSKI, 1993) e sequenciamento de nucleotídeos (GEERING et al., 2000). A expressão de sintomas de BSV em plantios de banana naturalmente infectados depende muito das mudanças de temperatura, variando portanto, de estação para estação (DAHAL et al., 1998). O número de plantas infectadas com BSV depende também dos genótipos de *Musa* sp. (DAHAL et al., 2000).

### **Família *Geminiviridae***

A família *Geminiviridae* se caracteriza por apresentar vírus de partículas icosaédricas geminadas e genoma constituído por uma ou duas moléculas de DNA de fita simples (ssDNA), sendo constituída de quatro gêneros: *Curtovirus*, *Mastrevirus*, *Topocuvirus* e *Begomovirus* (FAUQUET et al., 2008). Esses gêneros podem ser distinguidos com base na estrutura do genoma, tipo de inseto vetor e gama de hospedeiras (FAUQUET et al., 2008). *Curtovirus* são transmitidos por cigarrinha para dicotiledôneas e apresentam genoma bipartido, sendo o *Beet curly top virus* (BCTV) a espécie-tipo. Mastrevírus também são transmitidos por cigarrinha, mas infectam predominantemente monocotiledôneas, apresentam genoma monopartido e tem como espécie-tipo o *Maize streak virus* (MSV). *Topocuvirus*, o gênero mais novo da família, inclui um só membro, o *Tomato pseudo-curly top virus* (TPCTV), que tem genoma monopartido e é transmitido por cigarrinhas para plantas dicotiledôneas. Os begomovírus, consistem num dos gêneros de fitovírus mais numerosos, sendo transmitidos por mosca-branca para dicotiledôneas, podendo apresenta genoma bipartido ou monopartido, sendo o *Bean golden yellow mosaic virus* (BGYMV) a espécie-tipo (PRINGLE, 1999).

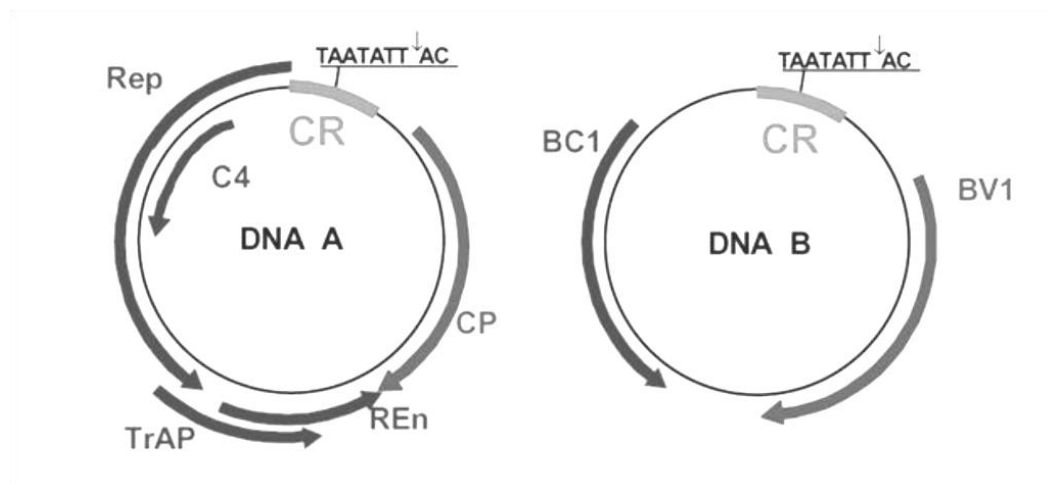
Os begomovírus podem ser divididos em dois grandes grupos com base em sua origem e distribuição geográfica. Os begomovírus do “Velho Mundo” (Europa, África e Ásia) geralmente apresentam um único componente genômico, enquanto os begomovírus do “Novo Mundo” possuem dois componentes genômicos denominados DNA-A e DNA-B (BRIDON et al., 2003) (Figura 2).

O DNA-A e DNA-B dos begomovírus bipartidos não apresentam similaridades na sequência, exceto por uma região quase idêntica denominada região comum. O DNA-A codifica proteínas responsáveis pela encapsidação (capa protéica) da progênie viral e proteínas envolvidas na replicação, enquanto o DNA-B codifica dois genes necessários para a

movimentação viral sistêmica no hospedeiro. A região comum é altamente conservada entre o DNA-A e DNA-B de cada espécie, divergindo entre os diferentes begomovírus. Esta região contém sinais para reconhecimento de processos comuns a ambos os genomas (replicação, iniciação de transcrição e encapsidação) (PADIDAM et al., 1996).

Nas últimas duas décadas, os begomovírus se tornaram vírus emergentes, em consequência do rápido e amplo aumento de sua incidência, principalmente nas regiões tropicais e subtropicais. Provavelmente as constantes epidemias de begomovírus estejam relacionadas com a expansão da *Bemisia tabaci* (Genn.) (Hemiptera: Aleyrodidae) biótipo B, um biótipo especialmente polífago, agressivo e de alta adaptabilidade (FRANÇA, 1996). No Brasil, o impacto das geminiviroses pode ser constatado em diversas culturas, sobretudo o tomateiro, para o qual são relatadas cerca de 15 espécies, dentre as reconhecidas e as tentativas (FERNANDES et al. 2008).

Os *Begomovirus* encontrados no tomateiro no Brasil formam um agrupamento distante de qualquer begomovírus relatado nos demais países, indicando para o fato de que provavelmente estes vírus evoluíram de maneira independente e isolada no Brasil. A hipótese mais aceita é a de que o biótipo B de *B. tabaci* funcionou como ponte para a transmissão e adaptação de begomovírus de plantas silvestres ou daninhas para o tomateiro. Registros de begomovírus em diversas plantas daninhas têm se acumulado (JOVEL et al., 2004; ASSUNÇÃO et al., 2006; ARNAUD et al., 2007; SILVA et al., 2011), porém a real importância das plantas daninhas como fonte dos begomovirus hoje presentes nas culturas economicamente importantes ainda carece de investigações.



**Figura 2.** Representação esquemática do genoma do *Bean golden yellow mosaic virus* (BGYMV), espécie-tipo do gênero Begomovirus. Os círculos representam o genoma viral, com dois componentes (DNA-A e DNA-B) de aproximadamente 2.600 nucleotídeos cada. Uma sequência de aproximadamente 200 nucleotídeos, denominada região comum (CR), contém a origem de replicação viral, com uma estrutura em forma de grampo e uma sequência invariável de nove nucleotídeos (TAATATT↓AC), conservada em todos os membros da família *Geminiviridae*. A seta (↓) indica o sítio de início da replicação do DNA viral por círculo rolante. As setas azuis e vermelhas indicam os genes virais e a direção em que ocorre a transcrição (viral e complementar, respectivamente). Reproduzido de (GUTIERREZ et al., 2004).

A sintomatologia não é suficiente para identificar e diferenciar os begomovírus, em decorrência da variação de sintomas atribuída principalmente à época de infecção da planta (idade), da cultivar considerada, de fatores ambientais e da ocorrência de infecções mistas (INOUE-NAGATA et al., 2004). Dessa forma, técnicas moleculares têm permitido o desenvolvimento de métodos de detecção universal e/ou específicos de forma eficiente, rápida, acurada e de forma otimizada para cada espécie de vírus.

A detecção dos begomovírus é feita principalmente por hibridização ou PCR. Os oligonucleotídeos desenvolvidos por Rojas et al. (1993) são amplamente utilizados com comprovada eficiência de amplificação dos isolados de begomovírus brasileiros (RIBEIRO et al., 2003; FERNANDES et al., 2008; SILVA et al. 2011). A determinação da sequência de nucleotídeos diretamente do fragmento amplificado por PCR é uma das ferramentas mais

utilizadas para se indicar a provável espécie presente na planta infectada. A identificação precisa da espécie é complexa e somente pode ser realizada a partir da determinação da seqüência do DNA-A completo do begomovírus.

O Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (ICTV) estabeleceu que 89% de identidade de nucleotídeos do DNA-A seria a percentagem de identidade limite para dois vírus serem considerados da mesma espécie (FAUQUET et al., 2008). Isto é, isolados com identidade de nucleotídeos inferior a 89% seriam considerados espécies distintas.

Até recentemente a clonagem e sequenciamento de genomas completos de begomovírus era complexa devido às dificuldades no isolamento da forma replicativa, pois esta encontra-se em baixa concentração. Entretanto, Inoue-Nagata et al. (2004) desenvolveram um método simples de clonagem utilizando a amplificação por círculo rolante (RCA = “rolling circle amplification”) seguido de digestão com enzima de restrição e ligação em vetor. Este método facilitou os procedimentos de clonagem e sequenciamento de um grande número de isolados. Recentemente Wyant et al. (2012) desenvolveram uma técnica que deve contribuir com estudos de caracterização e diversidade de begomovírus. Essa técnica, denominada Circomics, também se baseia em RCA, mas dispensa a etapa de clonagem.

Os geminivírus apresentam uma alta taxa de recombinação e este é considerado como o principal fator para o surgimento de novas espécies mais adaptadas e agressivas (PADIDAM et al., 1996). Mutações, pseudo-recombinação e principalmente recombinação, de ocorrência natural, contribuem fortemente para a geração de uma alta diversidade de espécies e estirpes dentro do gênero. A recombinação de DNA nos begomovírus pode ocorrer não somente entre isolados de um mesmo vírus, mas também entre espécies de gêneros distintos, o que resulta no rápido surgimento de novas formas virais (SEAL et al., 2006).

### **Gênero *Curtovirus***

O genoma dos curtovírus consiste de um componente único ssDNA circular, com 2,9-3,0 kb. As seqüências genômicas de *Beet curly top virus* (BCTV), *Beet mild curly top virus* (BMCTV), *Beet severe curly top virus* (BSCTV) e *Horseradish curly top virus* (HrCTV) já foram determinadas (HANLEY-BOWDOIN et al., 1999; HARRISON, 1985; ROJAS et al., 2005; TIMMERMANS et al., 1994). Seus genomas codificam de seis a sete proteínas (Figura 3). Três são codificadas na fita senso, que são a CP, capa protéica (ORF V1), envolvida no encapsidamento do genoma, no movimento do vírus e na transmissão pelo inseto vetor, proteína V2 que está envolvida na regulação dos níveis relativos de ssDNA e dsDNA, e a MP,



ou proteína de movimento (ORF V3). No sentido complementar são codificadas a proteína associada à replicação Rep (ORF C1), necessária para o início da replicação do DNA viral, a proteína C2, que atua como um fator de patogenicidade em alguns hospedeiros, uma proteína potencializadora da replicação (REN, ORF C3), e a proteína C4, uma determinante importante de sintomas que está envolvida no controle do ciclo celular (HANLEY-BOWDOIN et al., 1999). Comparações de seqüência de nucleotídeos sugerem que curtovírus e begomovírus divergiram depois de um evento de recombinação que alterou a especificidade no inseto vetor.

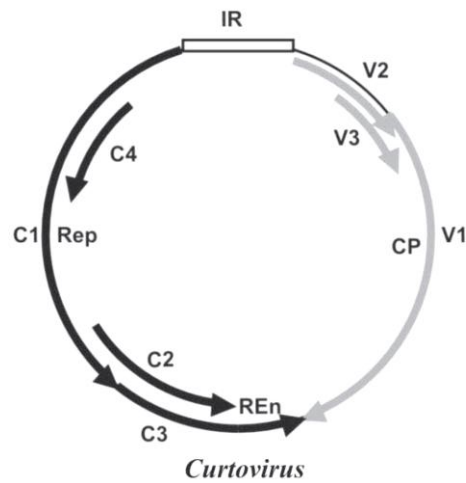
*Beet curly top virus*, a espécie tipo do gênero *Curtovirus*, é conhecida por ter causado sérios problemas na beterraba (*Beta vulgaris* L.) por quase um século e continua a ser um problema sério, não só de beterraba, mas também em outras culturas, como pimentão (*Capsicum annum* L.), melão (*Cucumis melo* L.), feijão (*Phaseolus vulgaris* L.), tomate (*Lycopersicon esculentum* L.), espinafre e uma variedade de plantas ornamentais e plantas daninhas (AGRIOS, 2005). As folhas de plantas afetadas desenvolvem clareamento de nervuras, enrolamento, malformações gerais e tornam-se coriáceas e quebradiças. As plantas atrofiam-se, desenvolvem necrose do floema, sendo que a infecção precoce geralmente resulta em morte prematura (BRUNT et al., 1996).

No final dos anos 1990 o BCTV surgiu como um sério problema de cultivo de pimenta (*Capsicum* spp.) no sul do Novo México e destruiu quase 80% da safra. Pimenteiras são suscetíveis à infecção em todas as fases de crescimento, mas a doença é mais grave quando as plantas são infectadas precocemente. Diversas plantas daninhas também são relatadas como hospedeiras do BCTV e em alguns casos constituem uma importante fonte de inóculo (BENNETT, 1969; CREAMER et al., 1996).

As infecções por curtovírus são consideradas como limitadas ao floema e a replicação viral, expressão de genes e a formação do vírus ocorre no núcleo (ESAU et al., 1967; LATHAM et al., 1997).

Os curtovírus podem ter evoluído através de alguns eventos de recombinação entre os gêneros *Mastrevirus* e *Begomovirus*. A Rep do BCTV é filogeneticamente mais relacionada com begomovírus enquanto a CP é mais estreitamente relacionada aos mastrevirus, embora uma parte da CP de BCTV seja muito mais próxima ao ACMV (begomovírus) do que aos mastrevirus (HARRISON, 1999). Recombinantes também têm surgido entre curtovírus e begomovírus; a seqüência de nucleotídeo de um clone infeccioso de HrCTV sugere que é um recombinante entre curtovírus e antepassados de begomovírus. A ORF V3 do HrCTV tem identidade 72-74% de aminoácidos com a ORF V3 do BCTV e as proteínas Rep e C4 são mais relacionadas filogeneticamente com *Squash leaf curl virus* (SLCV) (KLUTE et al., 1996).

Assim, a recombinação do genoma deve ter desempenhado um papel importante na evolução e surgimento de novas geminivíroses.



**Figura 3.** Organização genômica típica de curtovírus. As ORFs são demonstradas no sentido viral (V) e complementar (C) da fita. A designação dos genes é mostrada quando estes são conhecidos. A ORF C3 não está presente no *Horseradish curly top virus* (HrCTV). Está representada a posição do stem-loop contendo a sequência conservada TAATATTAC na região intergênica (IR). CP; proteína da capa, MP; proteína de movimento, Rep; proteína associada a replicação, REn; enhancer ou proteína que promove o aumento da replicação (VARMA; MALATHI, 2003).

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRIOS, G. N. **Plant pathology**. 5<sup>a</sup>. ed. Amsterdam: Elsevier, 2005. 922 p.

AHLAWAT, Y. S. P.; R.P.; LOCKHART, B.E.L.; SRIVASTAVA, M.; CHAKRABORTY, N. K.; VARMA, A. Association of a badnavirus with citrus mosaic disease in India. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 80, p. 590-592, 1996

AIGHEWI B. A. A., R.; AKORODA, M. O. Seed yam production from presprouted minisets with varied thicknesses of storage parenchyma. **African Journal of Root and Tuber Crops**, v. 5, p. 21-24, 2003.

ALEMAN-VERDAGUER M. E. G.-U. C.; DUBERN, J.; BEACHY, R.N.; FAUQUET, C. Analysis of the sequence diversity of the P1, HC, P3, NIb and CP genomic regions of several yam mosaic potyvirus isolates: implications for the intraspecies molecular diversity of potyviruses. **Journal of General Virology**, v.78, p. 1253-1264, 1997.

AMUSA, N. A.; ADEGBITA, A. A.; MUHAMMED, S.; DAIYEWU, R. Yam diseases and its management in Nigeria. **African Journal of Biotechnology**, v. 2, p. 497-502, 2003.

ARNAUD, L.S.E.P., SANTOS, C.D.G., LIMA, J.A.A., FEITOSA, F.A.A. Predominância de begomovírus em tomateiros na região produtora da Serra de Ibiapaba, Ceará, e sua detecção natural em plantas daninhas. **Fitopatologia Brasileira**, v. 32, p. 241-246, 2007.

ASIEDU, R. S.A. Crops that feed the World 1. Yams: Yams for income and foodsecurity. **Food Security**, v. 2, p.305-315, 2010.

ASSUNÇÃO, I.P.; LISTIK, A. F.; BARROS, M.C.S.; AMORIM, E.P.R.; SILVA, S.J.C.; SILVA, I. O.; RAMALHO-NETO, C.E.; LIMA, G.S.A. Diversidade genética de begomovírus que infectam plantas invasoras na Região Nordeste. **Planta Daninha**, v. 24, p. 239-244, 2006.

AYENSU, E. S.; COURSEY, D. G. Guinea yams. The botany, ethnobotany, use and possible future of yams in West Africa. Economic botany. **Biotechnology in Agriculture and Forestry**, v. 19, p. 135-159, 1972.

BENNETT, C. W. Seed transmission of plant viruses. **Advances in Virus Research** v. 14, p. 221-261, 1969.

- BOUSALEM, M.; DOUZERY, E. J. P.; FARGETTE, M. High genetic diversity, distant phylogenetic relationships and intraspecies recombination events among natural populations of Yam mosaic virus: a contribution to understanding potyvirus evolution. **Journal of General Virology**, v. 81, p. 243-255, 2000.
- BOUSALEM, M.; DOUZERY, E.J.P.; SEAL, S.E. Molecular taxonomy, phylogeny, and evolution of plant reverse transcribing viruses (Caulimoviridae) inferred from the reverse transcriptase sequences. **Archives Virology**, v. 153, p.1085-1102. 2008.
- BOUSALEM, M.; DURAND, O.; SCARCELLI, N.; LEBAS, B.S.M.; KENYON, L.; MARCHAND, J.-L.; LEFORT, F.; SEAL, S.E. Dilemmas caused by endogenous pararetroviruses regarding the taxonomy and diagnosis of yam (*Dioscorea* spp.) badnaviruses: analyses to support safe germplasm movement. **Archives of Virology**, v. 154, p. 297-314, 2009.
- BRIDDON, R. W. Cotton leaf curl disease, a multicomponent begomovirus complex. **Molecular Plant Pathology**, v. 4, p. 427-434, 2003.
- BRIDDON, R. W. P.; BRUNT, S. A.; HULL, R. Analysis of the sequence of *Dioscorea Alata* bacilliform virus: comparison to others members of the badnavirus group. **Virus Genes**, v. 18, p. 277-283, 1999.
- BOUHIDA, M. L.; LOCKHART, B.E.; OLSZEWSKI, N.E. An analysis of the complete sequence of a sugarcane bacilliform virus genome infectious to banana and rice. **Journal of General Virology**, v. 74, p.15-22, 1993
- BRUNT A. A., CRABTREE K., DALLWITZ M. J., GIBBS A. J., WATSON L., ZURCHER E. J. **Plant Viruses Online**: Descriptions and Lists from the VIDE Database, 1996. Disponível em: <<http://biology.anu.edu.au/Groups/MES/vid/>> acesso em: 16 jan.1997.
- CHENG Y.-H., YANG J.-S., YEH S.-D. Efficient transformation of papaya by coat protein gene of papaya ringspot virus mediated by agrobacterium following liquid-phase wounding of embryogenic tissues with caborundum. **Plant Cell Reports**, v. 16, p. 127-132, 1996.
- COOK, A. A.. **Diseases of tropical and sub tropical vegetables and other plants**. New York: Hafner Press, 1978. 381p.

COURSEY D. G. Internal brown spot, a condition in yams in Barbados. **Agricultural Society Trinidad Tobago**, v. 67, p.473-482, 1967.

CREAMER, R.; LUQUE-WILLIAMN, M.; HOWO, M. Epidemiology and incidence of beet curly top geminivirus in naturally infected weed hosts. **Plant Disease**, v. 80, p. 533-535, 1996.

DAHAL G. C., PASBERG-GAUHL, F., GAUHL, G., THOTTAPPILLY AND HUGHES, J.D'A. Studies on a Nigerian isolate of Banana streak virus: II Effect of intraplant variation on virus accumulation and reliability of diagnosis by ELISA. **Annals of Applied Biology**, v. 132, p.263-275, 1998.

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

DALLOT S. A., P.; RIVERA, C.; RAMIREZ, P.; CÔTE, F.; LOCKHART, B.E.L.; CARUANA, M.L. Evidence that the proliferation stage of micropropagation procedure is determinant in the expression of Banana streak virus integrated in the genome of FHIA 21 hybrid (Musa AAAB). **Archives of Virology**, v. 146, p. 2179-2190, 2001.

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

ESAU K., CRONSHAW J., HOEFERT L. L. Relation of beet yellows virus to the phloem and to movement in the sieve tube. **Journal of Cell Biology**, v. 32, p.71-87, 1967.

FAO. FAOSTAT. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/default.aspx>>. Acesso em: 16 jan. 2011.

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

FAUQUET C. M., BRIDDON R. W., BROWN J. K., MORIONES E., STANLEY J., ZERBINI F. M., ZHOU X. Geminivirus strain demarcation and nomenclature. **Archives of Virology**, v. 153, p. 783-821, 2008.

FERNANDES, F. R.; ALBUQUERQUE, L. C.; GIORDANO, L. B.; BOITEUX, L. S.; ÁVILA, A. C.; INOUE-NAGATA, A. K. Diversity and prevalence of Brazilian bipartite begomovirus species associated to tomatoes. **Virus Genes**, v. 36, p. 251-258, 2008.

FRANÇA, F.H.; VILLAS-BOAS, G.L.; CASTELO-BRANCO, M. Ocorrência de Bemisia argentifolii Bellows & Perring (Homoptera:Aleyrodidae) no Distrito Federal. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v.25, p. 369-372, 1996.

FUKUMOTO F, H TOCHIHARA. Chinese yam necrotic mosaic virus. **Annals of the Phytopathological Society**, Japan, v. 44, p.1-5, 1978.

GAUHL F., PASBERG-GAUHL,C., HUGHES, J. D'A. First report of banana streak badnavirus in plantain landraces in southern Cameroon, Central Africa. **Plant Disease**, v. 81, p. 1335-1335, 1997.

GAYRAL, P.; ISKRA-CARUANA, M. Phylogeny of Banana streak virus reveals recent and repetitive endogenization in the genome of its host (*Musa* sp.). **Journal of Molecular Evolution**, v.69, n. 1, p. 65-80, 2009.

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

GOUDOU-URBINO, C. K., G.; QUIOT, J. B.; DUBERN, J. Aetiology and ecology of a yam mosaic disease in Burkina Faso. **Tropical Sciences**, v. 36, p.34-40, 1996.

HAGEN L. S., JACQUEMOND, M., LEPINGLE, A., LOT, H., TEPFER, M.). Nucleotide sequence and genomic organisation of cacao swollen shoot virus. **Virology**, v. 196, p.619-628, 1993.

HAHN, S. K.; OSIRU, S. O.; AKORODA, M.; OTOO, J. A. Yam production and its future prospects. **Outlook on Agriculture**, v. 16, p.105-110, 1987.

- HANLEY-BOWDOIN, L.; SETTLAGE, S. B.; OROZCO, B. M.; NAGAR S.; ROBERTSON, D. Geminiviruses: Models for plant DNA replication, transcription, and cell cycle regulation. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 18, p.71-106, 1999.
- HARPER, G.; HART, D.; MOULT, S.; HULL, R.; GEERING, A.; THOMAS, J. The diversity of Banana streak virus isolates in Uganda. **Archives of Virology**, v. 150, p. 2407-2420, 2005.
- HARPER, G.; HULL, R. Cloning and sequence analysis of Banana Streak Virus DNA. **Virus Genes**, v. 17, p. 271-278, 1998.
- HARPER, G.; HULL, R.; LOCKHART, B.; OLSZEWSKI, N. Viral sequences integrated into plant genomes. **Annual Review of Phytopathology**, v. 40, p.119-136, 2002.
- HARPER, G.; DAHAL, G.; THOTTAPPILLY, G.; HULL, R. Detection of episomal Banana Streak Badnavirus by IC-PCR. **Journal of Virological Methods**, v.79, n. 1, p.1-8, 1999.
- HARRISON B. D. Advances in geminivirus research. **Annual Review of Phytopathology**, v. 23, p. 55-82, 1985.
- HARRISON, B. D.; ROBERTS, I. M. Association of virus-like particles with internal brown spot of yam (*Dioscorea alata*). **Tropical Agriculture**, v. 50, p.335-340, 1973.
- HARRISON, B. D.; ROBINSON D. J. Natural genomic and antigenic variation in white-fly transmitted geminiviruses (begomoviruses). **Annual Review of Phytopathology**, v. 39, p.369-398, 1999.
- HEARON, S. S.; LOCKE, J.C. Graft, pollen, and seed transmission of an agent associated with top spotting in *Kalançöe blossfeldiana*. **Phytopathology**, v. 74, p. 347- 350, 1984.
- HUGHES, J. D. A.; DONGO, L; ATIRI, G. I. Viruses infecting cultivated yams (*Dioscorea alata* and *D. rotundata*) in Nigeria. **Phytopathology**, v. 87, p.45, 1997.
- IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Censo Agropecuário 2006. Brasil. Rio de Janeiro: IBGE, 2006. 777p.
- ILYINA, T. V.; KOONIN, E. V. Conserved sequence motifs in the initiator proteins for rolling circle DNA replication encoded by diverse replicons from eubacteria, eucaryotes and archaeobacteria. **Nucleic Acids Research**, v. 20, p.3279-3285, 1992.

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

JAMES, M.; KENTEN, R. H.; WOODS, R. D. Virus-like particles associated with two diseases of *Colocasia esculenta* (L.) Schott in the Solomon Islands. **Journal of General Virology**, v. 21, p.145-153, 1973.

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

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

KING, A. M. Q.; ADAMS, M. J.; CARSTENS, E. B.; LEFKOWITZ, E. J. **Virus taxonomy**. Ninth Report of the International committee on Taxonomy of Viruses. Amsterdam. Elsevier. 2011.

KLUTE, K. A.; NADLER, S. A.; STENGER, D. C. Horseradish curly top virus is a distinct subgroup II geminivirus species with rep and C4 genes derived from a subgroup III ancestor. **Journal of General Virology**, v. 77, p.1369-1378, 1996.

LACO, G. S.; BEACHY, R. N. Rice tungro bacilliform virus encodes reverse transcriptase, DNA polymerase and ribonuclease H activities. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 91, p. 2654-2658.

LAFLEUR, D. A.; LOCKHART, B.E.L.; OLSZEWSKI, N.E. Portions of the banana streak badnavirus genome are integrated in the genome of its hosts *Musa* spp. **Phytopathology**, v. 86, p. 100-101, 1996.

LATHAM, J. R.; SAUNDERS, K.; PINNER, M. S.; STANLEY, J. Induction of plant cell division by beet curly top virus gene C4. **Plant Journal**, v. 11, p.1273-1283, 1997.

LEBOT, V. **Tropical root and tuber crops: cassava, sweet potato, yams, aroids**. CABI, Cambridge, 1999. 413 p. (Crop production science in horticulture series 17).



LLORENS, C.; MUNOZ-POMER, A.; BERNARD, L.; BOTELLA, H.; MOYA, A. Network dynamics of eukaryotic LTR retroelements beyond phylogenetic trees. **Biology Direct**, v. 4, p.41, 2009.

LOCKART, B. E. L.; KIRATIYA-ANGUL, K.; SILVA, P. De; OLSZEWSKI, N.E.; LOCKHART, N.; DEEMA, N.; SANGALANG, J. Identification of Piper yellow mottle virus, a mealybug transmitted badnavirus infecting *Piper* spp.. **Southeast Asia. European of Plant Pathology**, v. 103, p.303-311, 1997.

LOCKHART, B. E. L. Evidence for a double-stranded circular DNA genome in a second group of plant viruses. **Phytopathology**, v. 80, p.127-131, 1990.

LOCKHART, B. E. L.; OLSZEWSKI, N.E. Serological and genomic heterogeneity of banana streak badnavirus: implications for virus detection in *Musa* germplasm, Breeding Banana and Plantain for Resistance to Diseases and Pests. **CIRAD/INIBAP**, p. 105-113, 1993.

LOCKHART, B. E. L.; AUTREY, L. J. C. Occurrence in sugarcane of a bacilliform virus related serologically to banana streak virus. **Plant Disease** v. 72, p.230-233, 1988.

LOCKHART, B.E.L.; MENCKE, J.; DAHAL, G.; OLSZEWSKI, N.E. Characterization and genomic analysis of *Tobacco vein clearing virus*, a plant pararetrovirus that is transmitted vertically and related to sequences integrated in the host genome. **Journal of General Virology**, v. 81, n. 6, p. 1579-1585, 2000.

MANTELL S. H. Integrated use of micropropagation and conventional propagation Techniques for the production of certified seed tubers of tropical yams (*Dioscorea* spp.). In: **Proceedings of the Southern Asian Regional Workshop on Propagation techniques for Commercial Crops of the Tropics**. Ho Chi Minh City, 1993.

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

MIEGE, J. Influence de quelques caractères des tubercules semences sur la levée et le rendement des ignames cultivées. **Journal d'Agriculture Tropicale et de Botanique Appliquée**, v.4, p.315-341, 1957.

- MIGLIORI A.; LASTRA, R. Etude de vi rus present chez Commelina diffusa Burm. en Guadeloupe. **Annals of Phytopathology**, v. 10, p.467-477, 1978.
- MIGLIORI, A.; CADILHAC, B. Contribution to the study of a virus disease of yam: *Dioscorea trifida* in Guadeloupe. **Annals of Phytopathology**, v. 8, p.73-78, 1976.
- MOHAMED, K. A.; MANTELL, S. H. Incidence of virus symptoms in yam (*Dioscorea* sp.) foliage in the commonwealth Caribbean. **Tropical Agriculture**, v. 53, p.255-261, 1976.
- MOURA, R. M. Doenças do inhame-da-costa (*Dioscorea cayennensis*). In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A. **Manual de Fitopatologia: doenças das plantas cultivadas** São Paulo: Agronômica Ceres, 2005, p. 415-419.
- NDOWORA T. D., G.; LAFLEUR, D.; HAPPER, G.; HULL, R.; OLSZEWSKI, N.E.; LOCKHART, B.E.L. Evidence that badnavirus infection in *Musa* can originate from integrated pararetroviral sequences. **Virology**, v. 255, p.214-220, 1999.
- O'HAIR, S. K. Tropical root and tuber crops. **Horticultural Reviews**, v. 12, p.157-196. 1990.
- ODU, B. O. H.; J. D'A.; ASIEDU, R.; NG, N. Q.; SHOYINKA, S. A.; OLADIRAN, O. A. Responses of white yam (*Dioscorea rotundata*) cultivars to inoculation with three viruses. **Plant Pathology**, v. 53, p.141-147, 2004.
- OMURA, T.; MINOBE, Y.; KIMURA, I.; HIBINO, H.; TSUCHIZAKI, T.; SAITO, Y. Improved purification procedure and RNA segments of rice ragged stunt virus. **Annals of the Phytopathological Society of Japan**, v. 49, p. 670-675, 1983.
- PADIDAM M., BEACHY R. N., FAUQUET C. M. The role of AV2 ("precoat") and coat protein in viral replication and movement in tomato leaf curl geminivirus. **Virology** v. 224, p.390-404, 1996.
- PAHALAVATTA, V. D. K.; PAPPU, H. A. new and distinct species in the genus *Caulimoviridae* existits as an endogenous plant pararetroviral sequence in its host, *Dahlia variabilis*. **Virology**, v. 376, p.253-257, 2008.
- PHILLIPS, S.; BRIDDON, R. W.; BRUNT, A.; HULL, R. The Partial Characterization of a Badnavirus Infecting the Greater Asiatic or Water Yam (*Dioscorea alata*). **Journal of Phytopathology**, v. 147, p. 265-269, 1999.

PRINGLE, C.R. Virus taxonomy. **Archives of Virology**, v. 144, p. 2065-2070, 1999.

QAZI, J.; ILYAS, M.; MANSOOR, S.; BRIDDON, R. W. Legume yellow mosaic viruses: Genetically isolated begomoviruses. **Molecular Plant Pathology**, v. 8, p.343-348, 2007.

RIBEIRO, S.G.; AMBROZEVICIUS, L.P.; ÁVILA, A.C.; BEZERRA, I.C.; CALEGARIO, R.F.; FERNANDES, J.J.; LIMA, M.F.; MELLO, R.N.; ROCHA, H.; ZERBINI, F.M. Distribution and genetic diversity of tomato-infecting begomoviruses in Brazil. **Archives of Virology**, v. 148, p. 281-295, 2003.

RICHERT-POGGELER, K.R.; SHEPERD, R.J. Petunia vein clearing virus: a plant pararetrovirus with the core sequences for an integrase function. **Virology**, v. 236, n. 1, p.137-146, 1997.

ROBERTSON, D G. Notes in annual reports. **Federal Department of Agricultural Research**, Nigeria, p. 1959-1960, 1961.

ROJAS, M.R.; GILBERTSON, R.L.; RUSSELL, D.R.; MAXWELL, D.P. Use of degenerate primers in the polymerase chain reaction to detect whitefly-transmitted geminiviruses. **Plant Disease**, v. 77, p. 340-347, 1993.

ROJAS, M. R.; HAGEN, C.; LUCAS, W. J.; GILBERTSON, R. L. Exploiting chinks in the plant's armor: Evolution and emergence of geminiviruses. **Annual Review of Phytopathology**, v. 43, p. 361-394, 2005.

RYBICKI, E. P.; PIETERSEN, G. Plant virus disease problems in the developing world. **Advances in Virus Research**, v. 53, p. 127-175, 1999.

SANTOS, E. S. Manejo sustentável da cultura do inhame (*Dioscorea* sp.) no Nordeste do Brasil. 2002. In: II Simpósio Nacional sobre as Culturas do Inhame e do Taro. **Anais eletrônicos**. João Pessoa, PB, EMEPA-PB, 2002. Disponível em: <[http://www.emepa.org.br/anais/an\\_sincit2\\_v1.php](http://www.emepa.org.br/anais/an_sincit2_v1.php)>. Acesso em: 25 maio de 2007.

SEAL, S. E.; JEGER, M. J.; VAN DEN BOSCH, F. Begomovirus evolution and disease management. **Advances in Virus Research**, v. 67, p. 297-316, 2006.

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

- SELTH L, A.; RANGLES, J. W.; REZAIAN, M. A. Agrobacterium tumefaciens supports DNA replication of diverse geminivirus types. **FEBS Lett**, v. 516, p.179-182, 2002.
- SHUKLA, D.D.; FORD, R.E., TOSIC, M.; JILKA, J.; WARD, C.W. Possible members of the potyvirus group transmitted by mites or whiteflies share epitopes with aphid-transmitted definitive members of the group. **Archives of Virology**, v. 105, p. 143-151, 1989.
- SILVA, S.J.C.; CASTILLO-URQUIZA, G.P.; HORA-JÚNIOR, B.T.; ASSUNÇÃO, I.P.; LIMA, G.S.A.; PIO-RIBEIRO, G.; MIZUBUTI, E.S.G.; ZERBINI, F.M. Species diversity, phylogeny and genetic variability of begomovirus populations infecting leguminous weeds in Northeastern Brazil. **Plant Pathology**, in press, 2011.
- STAGINNUS, C.; RICHERT-PÖGGELER, K.R. Endogenous pararetroviruses: twofaced travelers in the plant genome. **Trends in Plant Sciences**, v. 11, p. 485-491, 2006.
- SU, L.; GAO, S.; HUANG, Y.; JI, C.; WANG, D.; MA, Y.; FANG, R.; CHEN, X. Complete genomic sequence of Dracena mottle virus, a distinct badnavirus. **Genes** v. 35, p.423-429, 2007.
- TEMIN, H. M. Reverse transcription in the eukaryotic genome: Retroviruses, pararetroviruses, retrotransposons, and retrotranscripts. **Molecular Biology and Evolution**, v. 2, p.455-468, 1985.
- TERRY, E. R. Incidence, symptomatology, and transmission of a yam virus in Nigeria. In: Proceedings of the 4th Symposium of the International Society for Tropical Root Crops. Cali, August 1976, Ed. J. COCK, R. MCINTYRE e M. GRAHAM, p. 170-173.
- THOUVENEL, J. C.; FAUQUET, C. Yam mosaic, a potyvirus infecting Dioscorea cayenensis in the Ivory Coast. **Annals of Applied Biology** 93:4. 1979
- THOUVENEL, J. C.; DUMONT, R. An epidemiological approach to the study of yam mosaic viruses in the Ivory Coast. Proc. Int. Soc. **Tropical Root Crops**, v. 45, p. 643-649, 1988.
- TIMMERMANS, M. C.; PREMDAS, O. E.; MESSING, J. Geminiviruses and their uses as extrachromosomal replicons. **Annual Review of Biochemistry and Molecular Biology**, v. 45, p. 79-112, 1994.

VARMA, A.; MALATHI, V. G. Emerging geminivirus problems: A serious threat to crop production. **Annals of Applied Biology**, v. 142, p. 145-164, 2003.

WYANT, P.S.; STROHMEIER, S.; SCHÄFER, B.; KRENZ, B.; ASSUNÇÃO, I. P.; LIMA, G. S.; JESKE, H. Circular DNA genomics (circomics) exemplified for geminiviruses in bean crops and weeds of northeastern Brazil. **Virology**, v. 247, p. 151-157, 2012.

WATERWORTH, H. E.; LAWSON, R. H.; KAHN, R. P. Purification, Electron Microscopy and Serology of Dioscorea latent virus. **Journal of Agriculture of the University of Puerto Rico**, v. 58, p. 351-357, 1974.

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

## CAPÍTULO II

---

**Diversidade de sequências entre isolados de badnavírus infectando inhame (*Dioscorea* spp.) no Nordeste brasileiro**

1 **Diversidade de sequências entre isolados de badnavírus infectando inhame (*Dioscorea***  
2 **spp.) no Nordeste brasileiro**

3

4 Joyce S. Lima<sup>3</sup>; Glória P. Castillo-Urquiza<sup>2</sup>; Alison T. M. Lima,<sup>2</sup>; Sarah J.C . Silva <sup>3</sup>;

5 Iraídes P. Assunção<sup>3</sup>; Gaus S. A. Lima <sup>1,3</sup> e Francisco M. Zerbini<sup>2</sup>

6

7 1 Departamento de Agronomia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife,  
8 Pernambuco, Brasil, 52171-900.

9 2 Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais,  
10 Brasil, 36570-000.

11 3 Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Alagoas, Rio Largo, Alagoas,  
12 Brasil, 57100-000.

13

14 \*Autor para correspondência: Gaus S. A. Lima

15 Email: gausandrade@yahoo.com.br

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

26

27

28

29

30

31

32

33

34

## 35 **Resumo**

36

37 Víruses causadas por vírus do gênero *Badnavirus* são responsáveis por grandes prejuízos à  
38 cultura do inhame, no Nordeste brasileiro. O conhecimento da diversidade da população  
39 deste patógeno pode fornecer importantes informações sobre o potencial evolutivo do vírus  
40 e as melhores estratégias de manejo da doença. A análise de sequências obtidas de vírus de  
41 inhame no ano de 2010 em três estados produtores do Nordeste brasileiro, revelaram uma  
42 alta incidência (93,3%) de badnavírus. Para avaliar a diversidade desse vírus infectando  
43 inhame, uma região codificante RT/RNaseH dos isolados amostrados foi amplificada por  
44 PCR e sequenciada. A análise filogenética das sequências de nucleotídeos revelou que os  
45 isolados dividiram-se em dois grupos distintos. Um altamente relacionado com o  
46 *Dioscorea alata bacilliform virus* (DaBV), já descrito anteriormente, enquanto outro grupo  
47 de sequências formou um clado altamente divergente do gênero *Badnavirus*. Os isolados  
48 dentro do grupo do DaBV apresentaram 70-98% de identidade nucleotídica entre si. O  
49 DaBV foi detectado em todas as áreas avaliadas e nas duas espécies de inhame mais  
50 cultivadas no Nordeste (*D. alata* e *D. cayanensis*). No entanto, o outro grupo compartilhou  
51 47-58% de identidade de sequências com isolados do DaBV e de 78-95% entre eles e foi  
52 encontrado apenas em *D. alata* na Paraíba. O sequenciamento completo do genoma dos  
53 isolados identificados está sendo realizado para a melhor elucidação do status taxonômico  
54 real.

55

56 **Palavras-chave:** *Dioscorea bacilliform virus*, RT/RNaseH, sequências endógenas.

57 .

58

59 Diseases caused by virus of *Badnavirus* genus are responsible for large losses in the yam  
60 crop in Northeastern Brazil. Knowledge of pathogen population diversity can provide  
61 important information about the evolutionary potential of the virus and the best strategies  
62 for disease management. The analysis of 425 leaf samples of yam obtained in 2010 in three  
63 producing states of Northeast Brazil, revealed a high incidence (93.3%) of badnaviruses.  
64 To evaluate the diversity of badnaviruses infecting yams, an encoding region RT/RNaseH  
65 of the sampled isolates were amplified by PCR and sequenced. Phylogenetic analysis of  
66 nucleotide sequences revealed that the isolates were divided into two distinct groups. The  
67 first group was highly correlated with *Dioscorea alata virus bacilliformis* (DaBV),  
68 previously described, while the other set of sequences formed a highly divergent clade of



69 Badnavirus genus. The isolates within DaBV group had 70-98% of nucleotide identity with  
70 each other. DaBV was detected in all areas assessed and in the two most cultivated species  
71 of yam in the Northeast (*D. alata* and *D. cayenensis*). However, the other group shared 47-  
72 58% of sequence identity with DaBV isolates and 78-95% between them and was found  
73 only in *D. alata* at Paraíba. The complete genome sequencing of the identified isolates is  
74 being conducted to better elucidate the real taxonomic status.

75

76 **Keyword:** *Dioscorea bacilliform virus*, RT/RNaseH, endogenous sequences

77

## 78 **Introdução**

79

80 O inhame (*Dioscorea* spp.) é uma cultura de importância econômica e social nas  
81 regiões tropicais, principalmente no Nordeste do Brasil que é responsável pela produção de  
82 38.256 toneladas (IBGE, 2006). No Nordeste brasileiro tem crescido bastante a área  
83 plantada com inhame e tem havido uma importante demanda para o mercado de  
84 exportação, contudo, os produtores não têm conseguido atingir as metas das empresas de  
85 comércio exterior, principalmente pela baixa qualidade do produto devido a problemas de  
86 ordem fitossanitária (Moura, 2005; Santos, 2002).

87 *Dioscorea cayenensis* Lam. e *D. alata* L. são as espécies predominantes nas regiões  
88 produtoras do Nordeste brasileiro. Uma vez que a floração e a produção de sementes são  
89 raras, o inhame é propagado por túberas semente ou seções da túbera. O uso de sementes  
90 verdadeiras como propágulos é restrita a estações de pesquisa, principalmente programas  
91 de melhoramento da cultura (Asiedu, 2010). A propagação assexuada do inhame, aumenta  
92 as chances de acúmulo e perpetuação de doenças, em especial das virais. Os sintomas de  
93 viroses em inhame, principalmente mosaico foliar, resultam da perda parcial da atividade  
94 fotossintética e frequentemente aumentam as taxas de senescência dos cloroplastos,  
95 levando a redução na produção de açúcar e armazenamento de amido, causando assim  
96 significativa redução no rendimento e qualidade das túberas (Thouvenel, 1990).

97 Alguns badnavírus, família *Caulimoviridae*, são descritos infectando uma ampla  
98 gama de culturas tropicais de importância econômica como cacau (*Theobroma cacao* L.)  
99 (Muller; Sackey, 2005), banana (*Musa* sp. L.) (Harper; Hull 1998), inhame (*Dioscorea*  
100 spp.) (Briddon et al., 1999) cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.) (Bouhida et al.,  
101 1993) e arroz (*Oryza sativa* L.) (Bouhida et al., 1993). Eles são vírus de DNA que replicam  
102 por meio de um intermediário de RNA utilizando a transcriptase reversa (pararetrovirus),

103 caracterizados por partículas baciliformes não envelopadas contendo um genoma circular  
104 de dsDNA com 7.0–7.6 kb (Fauquet et al., 2005). Os badnavírus que infectam inhame em  
105 vários países foram parcialmente caracterizadas por (Phillips et al., 1999), e duas espécies  
106 foram tentativamente denominadas como *Dioscorea alata bacilliform virus* (DaBV) e  
107 *Dioscorea bulbifera bacilliform virus* (DbBV).

108 Badnaviroses são amplamente distribuídas em todas as regiões onde há o cultivo de  
109 inhame, principalmente no oeste da África (Eni et al., 2008). No Brasil, embora  
110 encontrem-se plantas sintomáticas em grande parte das regiões produtoras, são escassos os  
111 estudos envolvendo a caracterização molecular dos vírus associados. A família  
112 *Caulimoviridae* tem recebido maior atenção desde a década passada devido à descoberta de  
113 sequências endógenas pararetrovirais (EPRVs). Acredita-se que EPRVs integram-se por  
114 recombinação ilegítima no genoma do hospedeiro, e sua presença não está necessariamente  
115 associada com a infecção (Geering et al., 2005; Harper et al., 1999; Ndowora et al., 1999).  
116 No entanto, em alguns casos, essas cópias cromossômicas podem dar origem ao vírus na  
117 forma episomal e gerar infecção sistêmica (Ndowora et al., 1999; Lockhart et al., 2000;  
118 Geering et al., 2005).

119 Recentemente, a análise de sequências parciais da região RT/RNaseH derivadas de  
120 DNA de vírus de inhame revelaram a presença de 11 novos grupos de badnavírus nas ilhas  
121 do Pacífico. Os resultados também sugerem que alguns dos grupos de badnavírus  
122 diferenciam-se em sequências endógenas e integradas (Kenyon et al., 2008). A utilização  
123 de abordagens baseadas em PCR para a detecção de badnavírus complica o diagnóstico  
124 preciso devido a falsos positivos decorrentes dessas sequências integradas (Harper et al.,  
125 1999; Le Provost et al., 2006).

126 Estudos moleculares de badnavírus infectando inhame e outras culturas revelaram  
127 alta variabilidade, no entanto o conhecimento sobre essa variabilidade ainda é escasso  
128 (Geering et al., 2000; Kenyon et al., 2008; Lockhart; Olszewski, 1993). Portanto, é  
129 importante determinar a variabilidade de sequências entre os badnavírus infectando inhame  
130 no Nordeste brasileiro para assegurar diagnósticos mais robustos e confiáveis.

131 O objetivo desse trabalho foi avaliar a variabilidade de sequências na região da  
132 transcriptase reversa (RT) e da ribonuclease H (RNaseH) de badnavírus infectando inhame  
133 nos estados de Alagoas, Pernambuco e Paraíba.

134

## 135 **Material e métodos**

136

### 137 **Obtenção dos isolados**

138 Foram coletadas amostras foliares de 100 plantas de inhame, sendo 20 provenientes  
139 de cada uma das cinco áreas de cultivo nas principais regiões produtoras da Zona da Mata  
140 dos estados de Alagoas, Pernambuco e Paraíba (Figura 1). As amostras foram coletadas de  
141 plantas apresentando sintomas característicos de infecção causada por vírus, como  
142 mosaico, cordão-de-sapato e nanismo (Figura 2).

143

### 144 **Amplificação da região RT e RNase H de badnavírus**

145

146 A extração do DNA total foi feita a partir de discos foliares de aproximadamente 1  
147 cm de diâmetro, provenientes de folhas jovens de plantas de inhame, de acordo com  
148 (Doyle & Doyle, 1987). O DNA total serviu de molde para as reações de amplificação por  
149 PCR de fragmentos de aproximadamente 579 pb. O par de oligonucleotídeos utilizados  
150 neste trabalho, BadnaFP (5'-ATGCCITTYGGIITIAARAAYGCICC-3') e BadnaRP (5'-  
151 CCAYTTRCAIACISCICCCCAICC-3') (Yang et al., 2003), foi baseado no domínio  
152 RT/RNaseH da ORF 3 do genoma de vários badnavírus já descritos.

153 As reações foram realizadas em volume total de 60 µL, contendo 6 µL de tampão  
154 10X (KCl 100 mM; Tris-HCl 100 mM pH 9,0; Triton-X 1%), 4,8 µL de dNTPs 2,5 mM,  
155 1,8 µL de MgCl<sub>2</sub> 50 mM, 3 µL de cada oligonucleotídeo 10 µM, 1U da Taq DNA  
156 Polimerase, 1 µL de DNA (10 a 100 ng) e 40 µL de água ultrapura. As condições de  
157 amplificação foram: desnaturação inicial de 94°C por 4 min, 94°C por 30 s, 50°C por 30 s,  
158 72°C por 30 s. Os ciclos foram repetidos 35 vezes exceto o passo inicial e a extensão final  
159 a 72°C por 10 min. Após a amplificação, os produtos foram analisados em gel de agarose a  
160 0,8%, em tampão TBE (Tris-Borato, EDTA 0,5M pH 8,0), corados com brometo de etídeo,  
161 visualizados sobre luz ultravioleta.

162

### 163 **Sequenciamento e análise filogenética**

164

165 Todos os produtos de PCR foram purificados utilizando o kit GFX™ PCR DNA  
166 and Gel Band Purification (GE Healthcare). O sequenciamento foi realizado pela  
167 Macrogen Inc. (Seul, Coréia do Sul) diretamente dos produtos de PCR purificados. As  
168 sequências de nucleotídeos foram inicialmente submetidas ao algoritmo BLASTn para a  
169 pesquisa da atribuição preliminar das espécies com base no nível limite de 80%  
170 estabelecido pelo ICTV (Fauquet et al., 2005). Comparações pareadas (*Parwise sequence*

171 *comparison*-PASC) foram geradas utilizando-se o programa DNAMAN versão 6 (Lynnon  
172 Biosoft Corporation) e estimada a porcentagem de identidade das sequências de  
173 nucleotídeos entre os isolados. As sequências foram alinhadas com o programa MUSCLE  
174 (Edgar, 2004) disponível no pacote computacional MEGA 5 (Molecular Evolutionary  
175 Genetics Analysis) (Tamura, 2007). As sequências alinhadas foram importadas para o  
176 programa PAUP\* 4 para análise filogenética. Árvores iniciais foram construídas usando o  
177 método Neighbour-Joining. Estas foram posteriormente comparadas com as árvores de  
178 consenso, construída a partir de análise de máxima verossimilhança com “bootstrapping”  
179 de 1000 repetições. Sequências de outras espécies pertencentes à família Caulimoviridae,  
180 disponíveis no GenBank, foram incluídas nas análises para comparação (Tabela 2). A  
181 Inferência Bayesiana foi feita, utilizando o programa MrBayes v3.1.2 (Ronquist;  
182 Huelsenbeck, 2003).

183

## 184 **Resultados**

185

186 Vários tipos de sintomas puderam ser observados nas áreas coletadas, denotando  
187 um forte indício de infecções mistas ou de mais de um vírus existentes na mesma região e  
188 não houve correlação clara entre os fenótipos dos sintomas observados (figura 2) e o vírus  
189 específico detectado já que a maioria dos tipos de sintomas estão associados a mais de um  
190 tipos de vírus.

191

### 192 **Amplificação da região RT / RNaseH de badnavírus**

193

194 O par de primer degenerado específico para o gênero *Badnavirus* (Badna-FP e  
195 Badna-RP) gerou o produto esperado de aproximadamente 580pb, que foi amplificado em  
196 109 das 116 amostras analisadas, não se verificando amplificações no controle negativo  
197 (representado por água ultrapura substituindo o DNA molde) (Figura 3). Um total de 100  
198 amplicons foram sequenciados e 93 produtos do sequenciamento foram utilizados para as  
199 análises. Com base nas identidades entre pares de sequência de nucleotídeo, foram  
200 escolhidas 50 sequências representantes com diferentes porcentagens de identidade entre  
201 elas para comparação com a sequência do DaBV (Figura 4).

202

### 203 **Sequenciamento e análise filogenética**

204

205 As 50 sequências nucleotídicas desse estudo foram alinhadas com outras sequências  
206 de badnavírus depositadas no Genbank (Tabela 1) e submetidas a análise filogenética com  
207 a finalidade de identificação em nível de espécies. Agrupamentos foram selecionados para  
208 refletir as diferenças de nucleotídeos de 20% na região RT / RNaseH, sendo este um  
209 critério para a demarcação de espécies do gênero *Badnavirus* (Hull et al., 2005). As  
210 análises de nucleotídeos mostraram que as sequências virais provenientes de inhame, no  
211 Nordeste do Brasil, podem ser divididos em dois grupos bem distintos, um agrupando com  
212 DaBV, já relatado como infectando inhame anteriormente, onde a PASC (Pairwise  
213 sequence comparison) mostrou alta identidade de sequências (76 a 89%) e o outro  
214 comportou-se como altamente divergente (47-59% de identidade) como mostra a Figura 4  
215 e provavelmente representam um novo gênero da família *Caulimoviridae* ou sequências  
216 endógenas desse pararetrovírus.

217 O Grupo I, mostrado na Figura 5 está representado pela maioria dos isolados (46 do  
218 total avaliado), e se relaciona com o DaBV, significativamente suportado pelos valores de  
219 *bootstrap* e probabilidades posteriores, segundo as análises de máxima verossimilhança e  
220 inferência Bayesiana respectivamente. As análises filogenéticas (máxima verossimilhança  
221 e inferência bayesiana) resultaram em árvores com topologias semelhantes. Ambas as  
222 árvores apresentaram um ramo monofilético contendo os isolados avaliados nesse trabalho  
223 e o já descrito DaBV, os quais possuem um ancestral comum com o *Dioscorea bacilliform*  
224 *virus* (DBV). O Grupo I, não está agrupado por origem geográfica ou espécies hospedeiras.  
225 Essa espécie esteve presente nas cinco áreas de cultivo nos três estados causando infecção  
226 tanto em em *D. cayennensis* quanto em *D. alata*.

227 O Grupo II, contendo apenas os isolados 9P, 11P, 12P e 18P provenientes de  
228 Alhandra-PB, comportou-se como altamente divergente apresentando identidades de  
229 sequências de apenas 47-59% entre as os demais isolados e o DaBV.

230

## 231 **Discussão**

232

233 Doenças causadas por vírus do gênero *Badnavirus* têm sido descritas em *Dioscorea*  
234 spp. em vários países produtores destacando-se as espécies *D. alata*, *D. cayennensis*, *D.*  
235 *rotundata* e *D. sansibarensis* na África (Hughes et al., 1997; Phillips et al., 1999; Olatunde,  
236 1999; Eni et al., 2008) e *D. bulbifera*, *D. dumetorum*, *D. nummularia* e *D. pentaphylla* no  
237 Sul do Pacífico (Phillips et al., 1999). As espécies mais amplamente cultivadas no  
238 Nordeste brasileiro são *D. alata* e *D. cayennensis*, as quais foram utilizadas neste estudo

239 sendo que em ambas se constatou a incidência de badnavírus. A presença de apenas uma  
240 espécie de *Badnavirus* detectada neste estudo deve-se, provavelmente à proximidade  
241 geográfica entre as áreas analisadas e a constante troca de material vegetal entre elas, o que  
242 acarreta a disseminação de túberas infectadas com determinados vírus.

243 Estes resultados corroboram com dados de análise de três sequências  
244 correspondentes à região RT/RNase provenientes de Cruz das Almas (Bahia), Itapissuma e  
245 Quipapá (Pernambuco), onde a única espécie de badnavírus encontrada foi DaBV  
246 (Andrade et al., 2007). A presença de DaBV em Alagoas, Bahia, Paraíba e Pernambuco,  
247 sugere uma ampla distribuição e prevalência dessa espécie na região Nordeste do Brasil.

248 No entanto, estudos realizados com o patossistema (*Dioscorea* spp. x *Badnavirus*)  
249 em países da África e do Sul do Pacífico revelaram a ocorrência de uma maior diversidade  
250 de espécies de badnavírus, sendo principalmente encontradas duas ou mais espécies por  
251 área. A maior incidência são de infecções causadas pelas espécies DaBV, DbBV e/ou  
252 *Dioscorea sansibarensis bacilliform virus* (DsBV) (Eni et al., 2008; Kenyon et al., 2008).

253 Também, foi constatada a presença de sequências muito divergentes das demais,  
254 indicando que provavelmente representam um novo gênero da Família *Caulimoviridae* ou  
255 tratam-se de sequências endógenas de pararetrovírus (EPRVs) que se encontram integradas  
256 ao genoma de inhame, a exemplo do que ocorre com EPRVs relacionados a badnavírus em  
257 bananeira (Gayral et al., 2009).

258 A amplificação dessas sequências pode ter ocorrido em consequência da técnica de  
259 PCR, utilizada para a detecção do vírus nas plantas de inhame, não eliminar a possibilidade  
260 de amplificação de sequências endógenas, tornando difícil a distinção de vírus que  
261 encontram na forma episomal ou ainda devido a variabilidade observada entre as  
262 sequências dos isolados, atribuída à replicação imprecisa por transcrição reversa e relatada  
263 para os membros da família *Caulimoviridae* (Medberry, 1990; Harper et al., 1999).

264 Resultados semelhantes foram descritos por (Kenyon et al., 2008), que encontraram  
265 vários grupos divergentes de sequências de badnavírus referentes à região RT/RNaseH em  
266 amostras de inhame no Sul do Pacífico, utilizando os mesmos pares de oligonucleotídeos  
267 utilizados neste e em outros estudos. Fortes evidências, como a alta identidade entre  
268 sequências do mesmo grupo, presença de deleções de aminácidos e ORFs não funcionais,  
269 além da associação com uma única hospedeira, indicam que alguns desses grupos de  
270 sequências podem ser pararetrovírus endógenos ou prováveis sequências integradas.

271 A forma endógena do vírus é de extrema importância na detecção de viroses e no  
272 que diz a respeito ao controle de doenças, pois vários fatores tem sido descritos como

273 desencadeantes de doenças devido a geração de formas epissomais dos vírus a partir das  
274 formas endógenas (Dahal et al., 2000; Harper et al., 1999), apesar desse processo ser ainda  
275 pouco estudado, já é sabido que ele de fato ocorre (Gayral e Iskra-Caruana, 2009).

276 A abordagem integrativa desenvolvida por (Bousalem et al., 2008) para a  
277 classificação dos membros da família *Caulimoviridae* com base na filogenia e análise  
278 utilizando PASC, as sequências RT parecem estar bem adaptadas à classificação de  
279 badnavírus de inhame. No entanto, neste estudo, PCR-positivos devido à amplificação de  
280 EPRVs, puderam ser obtidos a partir de DNAs total das plantas utilizadas. Portanto, é de  
281 grande importância o diagnóstico para diferenciar entre sequências virais epissomal e  
282 integrada. O dilema vem da dificuldade em aplicar um determinado método para a  
283 detecção de EPRVs em um conjunto de sequências extremamente heterogêneo. A falta de  
284 anti-soros específicos para qualquer badnavirus de inhame (Kenyon et al., 2008), que são  
285 essenciais para IC-PCR de partículas epissomais, complica ainda mais este dilema.

286 James et al. (2011) desenvolveram uma metodologia de RCA para a detecção de  
287 BSV utilizando amostras de banana conhecidas por conterem sequências epissomais ou  
288 endógenas ativáveis de *Banana streak virus* (eaBSVs) já caracterizados, demonstraram  
289 ainda que, ao contrário de PCR, o RCA amplifica especificamente o genoma circular  
290 epissomal de BSV e não sequências integradas do mesmo. A capacidade de diagnóstico de  
291 RCA para identificação de BSV foi inicialmente validada pela detecção de *Banana streak*  
292 *Mysore virus* (BSMyV) em bananeira. Posteriormente, RCA foi usada para detectar a  
293 presença de *Banana streak OL virus* (BSOLV) na Austrália e Uganda, bem como *Banana*  
294 *streak Uganda I virus* (BSUgIV), *Banana streak Uganda L virus* (BSUgLV), *Banana streak*  
295 *Uganda M virus* (BSUgMV) e *Banana streak GF virus* (BSGFV) em Uganda. Este foi o  
296 primeiro relato confirmado de BSUgIV, BSUgLV, e BSUgMV epissomais em Uganda,  
297 apesar de sequências parciais destes três vírus terem sido previamente relatadas (Harper et  
298 al., 2005).

299 Certas condições de estresse, como a cultura de tecidos, hibridação e eventos de  
300 recombinação que ocorrem nas sequências integradas, podem levar à reconstituição do  
301 genoma viral na forma ativado e, assim, resultando em infecções epissomais (Côte et al.,  
302 2010; Dallot et al., 2001; Ndwora et al., 1999). Genomas integrados incompletos já foram  
303 relatados fazendo parte dos genomas A (*Musa acuminata* Colla) e B (*M. balbisiana* Colla)  
304 de bananeiras derivadas de progenitores selvagens domesticados (Gayral et al., 2008;  
305 Geering, 2001; Geering et al., 2005). Os resultados deste estudo têm várias implicações  
306 importantes para o diagnóstico de badnavirose em inhame. Essas viroses podem ser

307 consideradas de grande importância como fator limitante no intercâmbio nacional e  
308 internacional de material propagativo, devido à presença de sequências integradas, as quais  
309 podem ser ativadas e causar doença.

310 Desde a última década, as técnicas de PCR e IC-PCR tem sido utilizadas para o  
311 diagnóstico de badnavirose em várias culturas, no entanto, estes testes tem várias  
312 limitações, incluindo a incapacidade do anti-soro em captar todos os isolados virais; a  
313 disponibilidade apenas de primers específicos que amplificam somente alguns grupos ou  
314 espécies virais, não diferenciando estirpes (Geering et al., 2000; Geering et al., 2005;  
315 Harper et al., 2005; Lheureux et al., 2007), e a ocorrência de falsos positivos devido à  
316 presença de cópias de sequências integradas. Com o aprimoramento e adaptação do RCA  
317 para outras espécies de vírus de genoma circular, a confirmação do status taxonômico de  
318 espécies do gênero *Badnavirus* será mais precisa, já que possui a capacidade de amplificar  
319 seletivamente o DNA circular e não o linear (integrado), superando as limitações da IC-  
320 PCR. Devido à falta de testes robustos de diagnose com a capacidade de detectar a vasta  
321 gama de variabilidade genômica e sorológica que se conhece dentro de espécies do gênero  
322 *Badnavirus*, tanto a diagnose para controle de viroses, quanto à taxonomia ficam  
323 comprometidas.

324 Este representa o estudo mais abrangente, a nível molecular a respeito da  
325 diversidade de sequências de badnavírus de inhame no Brasil e indica ainda uma ampla  
326 distribuição do DaBV na região Nordeste.

327

### 328 **Agradecimentos**

329 A primeira autora agradece à CAPES e a FAPEAL pela concessão da bolsa de estudos e  
330 pelo auxílio mobilidade discente fornecido para a realização dos trabalhos nas instituições  
331 parceiras.

332

### 333 **Referências bibliográficas**

334

335 Andrade GP (2007). Diagnóstico fitossanitário da cultura do inhame (*Dioscorea spp*) em  
336 áreas produtoras do Nordeste do Brasil. Tese Doutorado, Universidade Federal Rural de  
337 Pernambuco (UFRPE) 88p.

338 Asiedu R, Sartie A (2010) Crops that feed the World 1. Yams: Yams for income and  
339 foodsecurity. Food Security 2:305-315.



- 340 Bouhida ML, Lockhart BE, Olszewski NE (1993) An analysis of the complete sequence of  
341 a sugarcane bacilliform virus genome infectious to banana and rice. *Journal of General*  
342 *Virology* 74:15-22.
- 343 Bousalem M, Douzery EJP, Seal SE (2008) Molecular taxonomy, phylogeny, and  
344 evolution of plant reverse transcribing viruses (*Caulimoviridae*) inferred from the reverse  
345 transcriptase sequences. *Archives Virology* 153:1085-1102.
- 346 Briddon RW, Phillips S, Brunt A, Hull R (1999) Analysis of the sequence of *Dioscorea*  
347 *Alata* bacilliform virus: comparison to others members of the badnavirus group. *Virus*  
348 *Genes* 18:277-283.
- 349 Côte FX, Galzi S, Folliot M, Lamagnère Y, Teycheney P-Y, Iskra-Caruana M-L (2010).  
350 Micropropagation by tissue culture triggers differential expression of infectious  
351 endogenous Banana streak virus sequences (eBSV) present in the B genome of natural and  
352 synthetic interspecific banana plantains. *Molecular Plant Pathology* 11:137-144.
- 353 Dahal GOR, Tenkouano A, Hughes J D'A, Thottappilly G, Vuylsteke D, Lockhart EBL  
354 (2000) Relationship between natural occurrence of banana streak badnavirus and symptom  
355 expression, relative concentration of viral antigen, and yield characteristics of some  
356 micropropagated *Musa* spp. *Plant Pathology* 49:68-79.
- 357 Dallot SAP, Rivera C, Ramirez P, Côte F, Lockhart BE.L, Caruana ML (2001) Evidence  
358 that the proliferation stage of micropropagation procedure is determinant in the expression  
359 of Banana streak virus integrated in the genome of FHIA 21 hybrid (*Musa* AAAB).  
360 *Archives of Virology* 146:2179-2190.
- 361 Doyle JJ, Doyle JL (1987) A rapid DNA isolation procedure for small amounts of fresh  
362 leaf tissue. *Phytochemical Bulletin* 19:11-15.
- 363 Edgar RC (2004) MUSCLE: A multiple sequence alignment method with reduced time and  
364 space complexity. *Bmc Bioinformatics* 5:1-19.
- 365 Eni AO, Hughes J D'A, Rey MEC (2008) Survey of the incidence and distribution of five  
366 viruses infecting yams in the major yam-producing zones in Benin. *Annals of Applied*  
367 *Biology* 153:223–232.
- 368 Eni AOJ, Hughes D'A, Asiedu R, Rey MEC (2008) Sequence diversity among badnavirus  
369 isolates infecting yam (*Dioscorea* spp.) in Ghana, Togo, Benin and Nigeria. *Archives*  
370 *Virology* 153:2263-2272.
- 371 Fauquet C, Mayo M, Maniloff J, Desselberger U, Ball L (2005) *Virus taxonomy. Eight*  
372 *Report of the International committee on Taxonomy of Viruses*. Amsterdam. Elsevier.

- 373 Gayral P, Iskra-Caruana M (2009) Phylogeny of Banana Streak Virus Reveals Recent and  
374 Repetitive Endogenization in the Genome of Its Banana Host (*Musa* sp.). *Journal of*  
375 *Molecular Evolution* 69: 65-80.
- 376 Gayral P, Noa-Carrazana J-C, Lescot M, Lheureux F, Lockhart BEL, Matsumoto T,  
377 Piffanelli P, Iskra-Caruana M-L (2008) A single Banana streak virus integration event in  
378 the banana genome as the origin of infectious endogenous pararetrovirus. *Journal of*  
379 *Virology* 82:6697-6710.
- 380 Geering ADW, McMichael LA, Dietzgen RG, Thomas JE (2000) Genetic diversity among  
381 Banana streak virus isolates from Australia. *Phytopathology* 90:921-927.
- 382 Geering ADW, Olszewski NE, Harper G, Lockhart BEL, Hull R, Thomas JE (2005)  
383 Banana contains a diverse array of endogenous badnaviruses. *Journal of General Virology*  
384 86:511-520.
- 385 Geering ADW, Olszewski NE, Dahal G, Thomas JE, Lockhart BEL (2001) Analysis of the  
386 distribution and structure of integrated Banana streak virus DNA in a range of *Musa*  
387 cultivars. *Molecular Plant Pathology* 2:207-213.
- 388 Harper G, Hart D, Moulton S, Hull R, Geering A, Thomas J (2005) The diversity of Banana  
389 streak virus isolates in Uganda. *Archives of Virology* 150:2407-2420.
- 390 Harper G, Hull R (1998) Cloning and sequence analysis of Banana Streak Virus DNA.  
391 *Virus Genes* 17:271-278.
- 392 Harper GO, Suji JO, Heslop-Harrison JS, Hull R (1999) Integration of banana streak  
393 badnavirus into the *Musa* genome: molecular and cytogenetic evidence. *Virology* 255:207-  
394 219.
- 395 Hughes JD'A, Dongo L, Atiri GI (1997) Viruses infecting cultivated yams (*Dioscorea alata*  
396 and *D. rotundata*) in Nigeria. *Phytopathology* 87:45.
- 397 Hull R, Geering A, Harper G, Lockhart BE, Schoelz JE (2005) Family Caulimoviridae.  
398 San Diego. Elsevier 385-396.
- 399 IBGE (2006). Censo Agropecuário . Brasil. 777.
- 400 James AP, Geijskes RJ, Dale JL, Harding RM (2011) Development of a Novel Rolling-  
401 Circle Amplification Technique to Detect Banana streak virus that also Discriminates  
402 Between Integrated and Episomal Virus Sequences. *Plant Disease* 95:57-62.
- 403 Kenyon L, Lebas BSM, Seal SE (2008) Yams (*Dioscorea* spp.) from the South Pacific  
404 Islands contain many novel badnaviruses: implications for international movement of yam  
405 germplasm. *Archives of Virology* 153:877-889.

- 406 Le Provost G, Iskra-Caruana M, Acina I, Teycheney P (2006) Improved detection of  
407 episomal Banana streak viruses by multiplex immunocapture PCR. *Journal of Virological*  
408 *Methods* 137:7-13.
- 409 Lheureux F, Laboureau N, Muller E, Lockhart BEL, Iskra-Caruana ML (2007) Molecular  
410 characterisation of banana streak acuminata Vietnam virus isolated from *Musa acuminata*  
411 *siamea* (banana cultivar). *Archives Virology* 152:1409-1416.
- 412 Lockhart BEL, Olszewski NE (1993) Serological and genomic heterogeneity of banana  
413 streak badnavirus: implications for virus detection in *Musa* germplasm, *Breeding Banana*  
414 *and Plantain for Resistance to Diseases and Pests*. CIRAD/INIBAP 105-113.
- 415 Lockhart BEL, Mencke J, Dahal G, Olszewski NE (2000) Characterization and genomic  
416 analysis of Tobacco vein clearing virus, a plant pararetrovirus that is transmitted vertically  
417 and related to sequences integrated in the host genome. *Journal of General Virology*  
418 81:1579-1585.
- 419 Medberry SL, Lockhart BEL, Olszewski, NE (1990) Properties of Commelina yellow  
420 mottle virus complete DNA sequence, genomic discontinuities and transcript suggest that it  
421 is a pararetrovirus. *Nucleic Acids Research* 18:5505-5513.
- 422 Moura RM (2005) *Doenças do inhame-da-costa (Dioscorea cayennensis)*. 4 Ed. São Paulo.  
423 Agronômica Ceres.
- 424 Muller E, Sackey S (2005) Molecular variability analysis of five new complete cocoa  
425 swollen shoot virus genomic sequences. *Archives of Virology* 150:53-66.
- 426 Ndowora T, Dahal G, LaFleur D, Happer G, Hull R, Olszewski NE, Lockhart BEL (1999)  
427 Evidence that badnavirus infection in *Musa* can originate from integrated pararetroviral  
428 sequences. *Virology* 255:214-220.
- 429 Olatunde OJ (1999) *Viruses of Yam in Ghana*, M. Sc.Thesis. University of Greenwich,  
430 U.K. p.33.
- 431 Phillips S, Briddon RW, Brunt A, Hull R(1999) The Partial Characterization of a  
432 Badnavirus Infecting the Greater Asiatic or Water Yam (*Dioscorea alata*). *Journal of*  
433 *Phytopathology* 147:265-269.
- 434 Ronquist F, Huelsenbeck JP (2003) MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under  
435 mixed models. *Bioinformatics* 19:1572-1574.
- 436 Santos ES (2002) Manejo sustentável da cultura do inhame (*Dioscorea* sp.) no Nordeste do  
437 Brasil. II Simpósio Nacional sobre as Culturas do Inhame e do Taro. João Pessoa-PB.
- 438 Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S (2007) MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics  
439 Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 24:1596-1599.

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

442 Yang, IC, Hafner, GJ, Dale, JL, Harding, RM (2003) Genomic characterisation of taro  
443 bacilliform virus. *Archives of Virology* 148: 937-949.

444

445

446

447

448

449

450

451

452

453

454

455

456

457

458

459

460

461

462

463

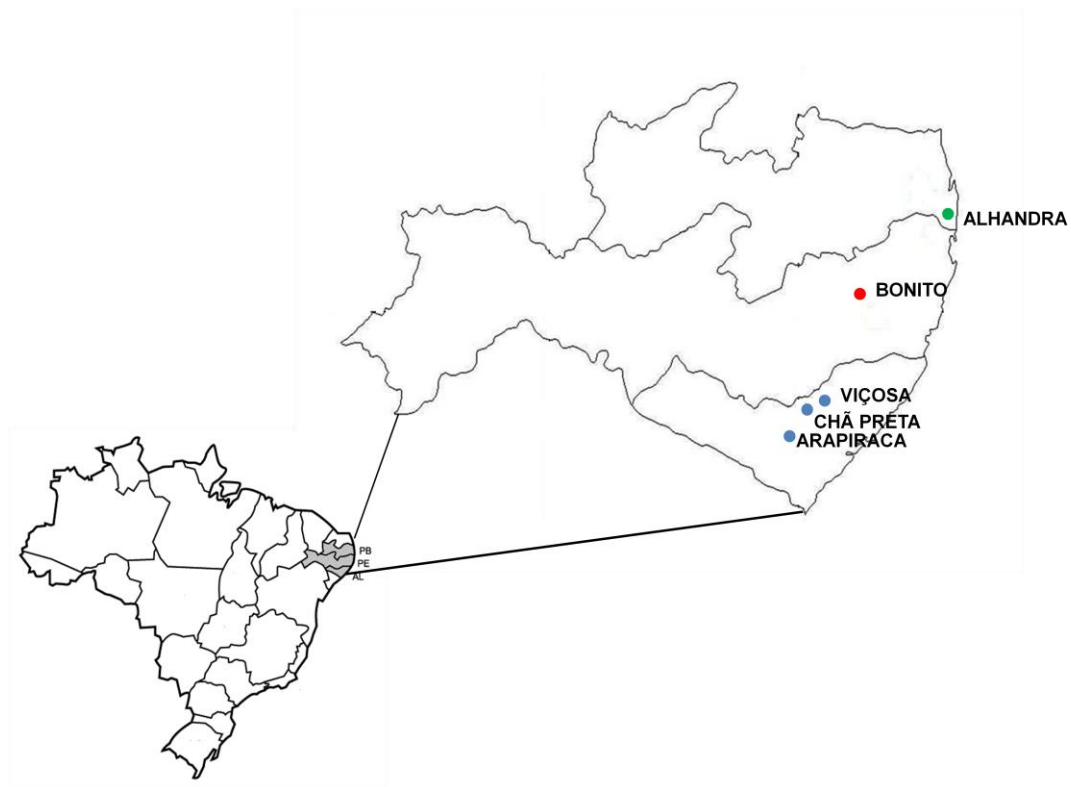
464

465

466

467

468



469

470

471 **Figura 1.** Mapa indicando os locais de coleta em áreas de cultivos de inhame (*Dioscorea*

472 spp.) nos Estados de Paraíba (em verde), Pernambuco (em vermelho) e Alagoas (em azul).

473

474

475

476

477

478

479

480

481

482

483



484

485 **Figura 2.** Plantas de *Dioscorea* spp. apresentando sintomas de doenças causadas por vírus;

486 A: cordão-de-sapato, B: nanismo e distorção foliar, C: clorose intervenal e D: mosaico.

487

488

489

490

491

492

493

494 **Tabela 1.** Vírus da família *Caulimoviridae* depositados no GenBank utilizados para  
 495 análise filogenética com os isolados de badnavírus em inhame.

<i>Vírus (Acrônimo)</i>	<b>Nº de acesso</b>
<i>Dioscorea bacilliform virus (DBV)</i>	DQ822073
<i>Kalanchoe top-spotting virus (KTSV)</i>	AY180137
<i>Sugarcane bacilliform IM virus (SCBIMV)</i>	AJ277091
<i>Taro bacilliform viruso (TBV)</i>	AF357836
<i>Rice tungro bacilliform virus (RTBV)</i>	X57924
<i>Banana streak GF virus (BSGFV)</i>	AY493509
<i>Banana streak Mysore virus (BSMyV)</i>	AY805074
<i>Banana streak OL virus (BSOLV)</i>	AJ002234
<i>Cacao swollen shoot virus (CSSV)</i>	L14546
<i>Commelina yellow mottle virus (ComYMV)</i>	X52938
<i>Dioscorea alata bacilliform virus ((DaBV)</i>	X94575

496

497

498

499

500

501

502

503

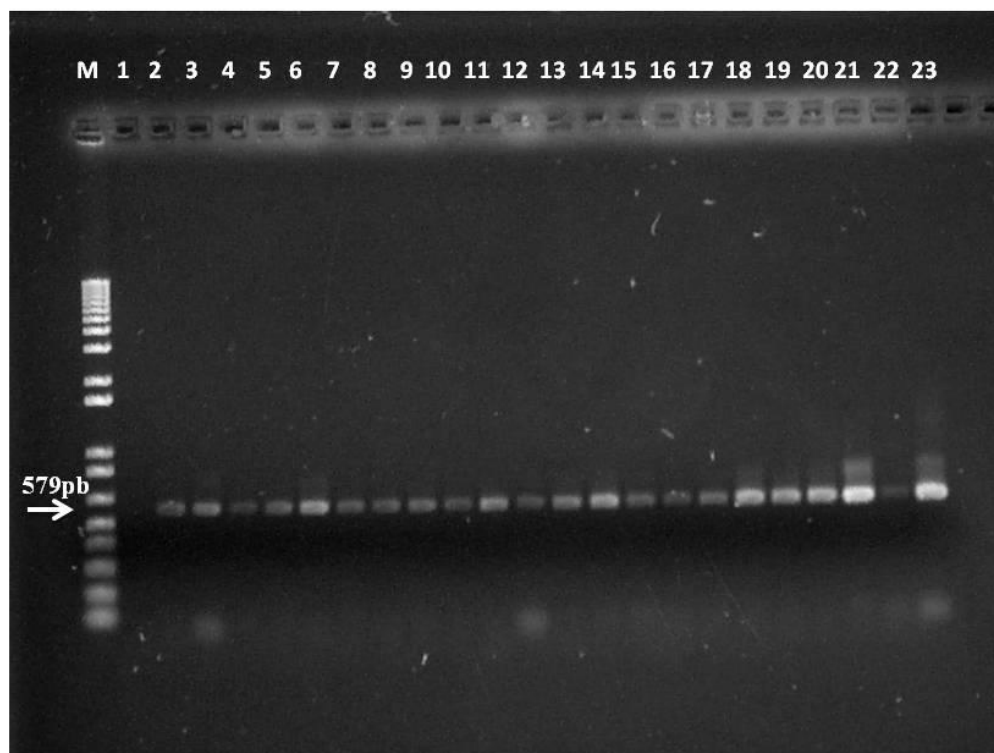
504

505

506

507

508



509

510 **Figura 3:** Padrão eletroforético em gel de agarose (0,7%) de amplicons obtidos a partir de  
511 amostras de DNA total. **M**, marcador (1 Kb plus DNA ladder); **1**: controle negativo;  
512 **2**: controle positivo; **3 a 23**: Isolados de inhame do município de Alhandra-PB.

513

514

515

516

517

518

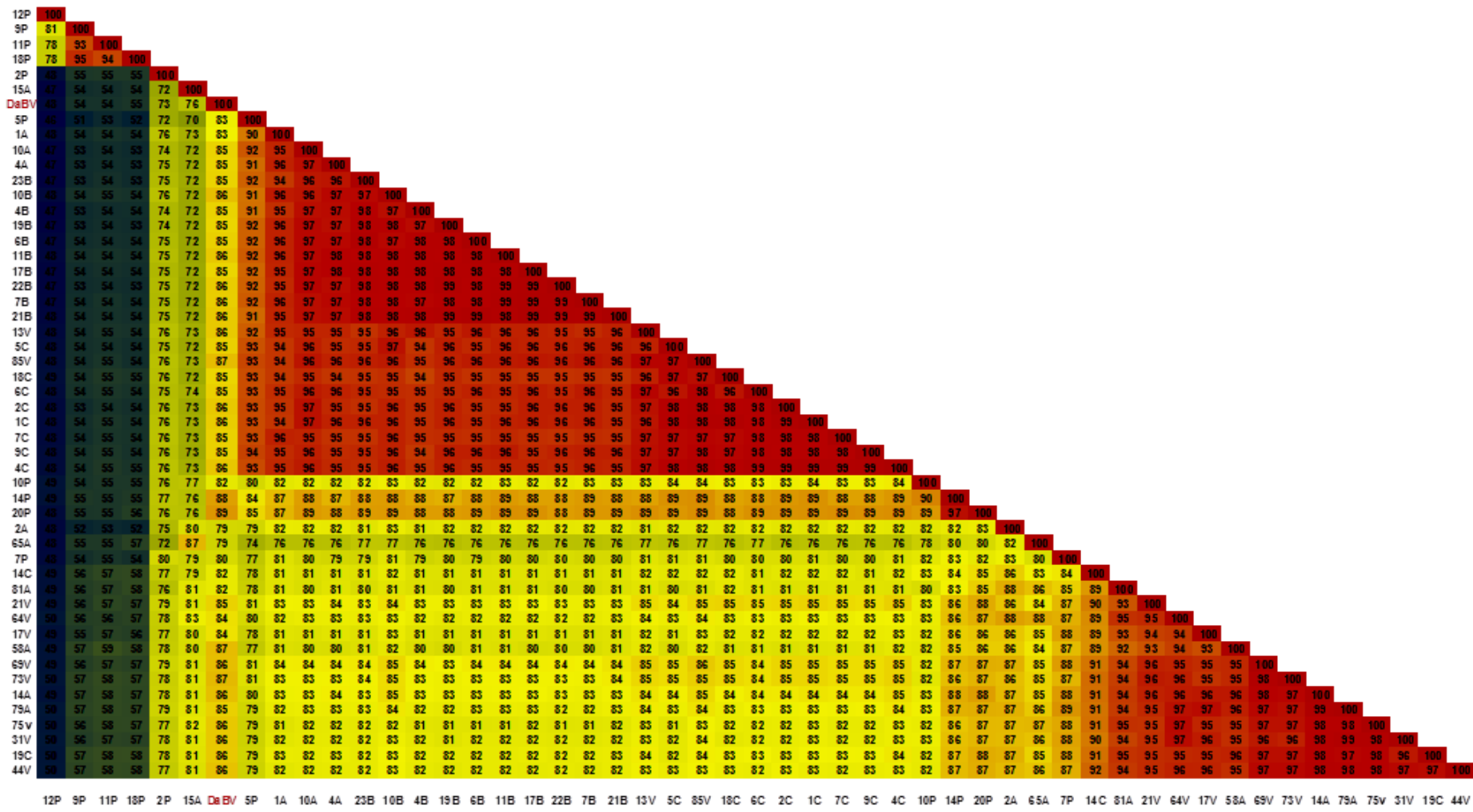
519

520

521

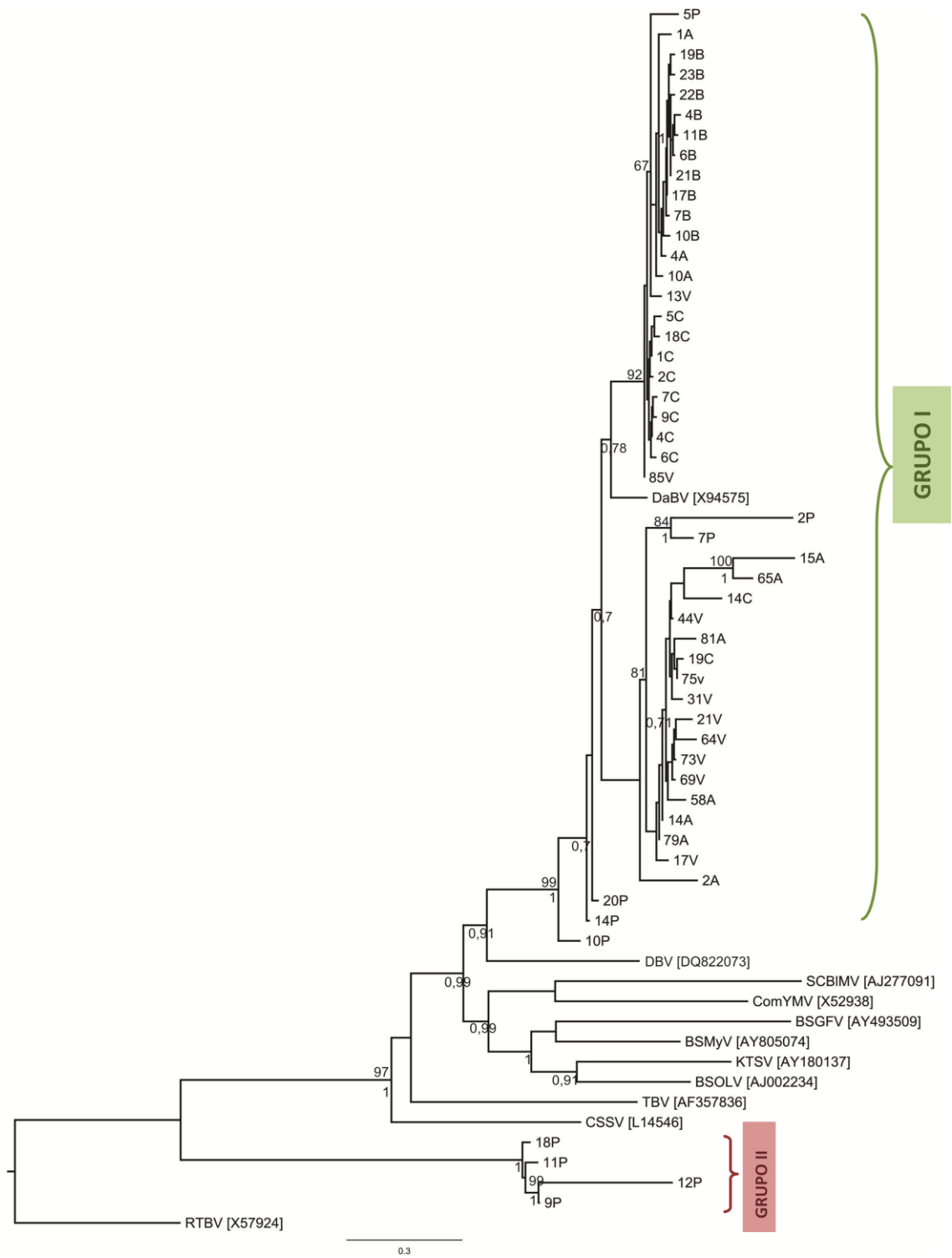
522





523

524 **Figura 4.** Porcentagem de identidade nucleotídica entre os isolados avaliados e o *Badnavirus* mais relacionado (DaBV) já descrito.



526

527 **Figura 5.** Árvore de máxima verossimilhança baseada nas sequências parciais da região  
 528 RT/RNase H de *Badnavirus* e sequências referência depositadas no Genbank. Os números  
 529 acima nos ramos indicam valores de bootstrap (1000 repetições) e abaixo os números das  
 530 probabilidades posteriores utilizando o método Bayesiana.

### CAPÍTULO III

---

#### **Infecção de plantas de inhame (*Dioscorea* spp.) por geminivírus no Brasil**

1 **Infecção de plantas de inhame (*Dioscorea* spp.) por geminivírus no Brasil**

2

3 Joyce S. Lima<sup>3</sup>; Glória P. Castillo-Urquiza<sup>2</sup>; Alison T. M. Lima, <sup>2</sup>; Sarah J.C . Silva <sup>3</sup>;  
4 Iraídes P. Assunção<sup>3</sup>; Roberto Ramos sobrinho<sup>2</sup>; Gaus S. A. Lima <sup>1,3</sup> e Francisco M.  
5 Zerbini<sup>2</sup>

6

7 <sup>1</sup>Departamento de Agronomia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife,  
8 Pernambuco, Brasil, 52171-900.

9 <sup>2</sup>Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas  
10 Gerais, Brasil, 36570-000.

11 <sup>3</sup>Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Alagoas, Rio Largo, Alagoas,  
12 Brasil, 57100-000.

13

14 \*Autor para correspondência: Gaus S. A. Lima

15 Email: gausandrade@yahoo.com

16

17

18 Trabalho a ser submetido a revista Tropical Plant Patholgy (TPP-normas em anexo no  
19 final do capítulo)

20

21

22

23

24

25

26

27

## 28 **Resumo**

29 Os geminivírus (família *Geminiviridae*) são um diversificado grupo de vírus que  
30 apresentam genoma composto de DNA fita simples (ssDNA) circular encapsidado em  
31 um capsídeo icosaédrico geminado. Esses vírus são responsáveis por várias doenças  
32 economicamente significantes em culturas de todas as regiões tropicais e subtropicais  
33 do mundo. Em um estudo de investigação de viroses que afetam a cultura do inhame no  
34 Nordeste brasileiro, foram coletadas amostras nos estados de Alagoas, Pernambuco e  
35 Paraíba, importantes produtores nacionais. Dentre as amostras analisadas foram  
36 encontradas duas possíveis novas espécies de geminivírus, uma pertencente ao gênero  
37 begomovirus e outra pertencente ao gênero *Curtovirus*. O begomovírus caracterizado  
38 apresentou identidade máxima de 87% com um isolado do *Tomato golden mosaic virus*  
39 (TGMV). O Curtovírus apresentou tamanho de aproximadamente 2,9 kb e alta  
40 identidade (>90% ) com o *Beet severe curly top virus* (BSCTV) descrito na cultura da  
41 beterraba. A incidência e a importância econômica dessas novas doenças precisam ser  
42 determinadas nas condições do Nordeste, assim como sua forma de transmissão e  
43 possíveis hospedeiras alternativas. O relacionamento dessas espécies condiz com os  
44 eventos evolucionários relacionados à família *Geminiviridae*, onde os curtovírus  
45 surgiram a partir da recombinação entre os gêneros *Mastrevirus* e *Begomovirus*. Esse é  
46 o início de um estudo de grande importância para a evolução de geminivirose no  
47 Brasil, pois o sequenciamento de outros clones e confirmações biológicas ainda estão  
48 sendo realizadas.

49

50 **Palavras-chave:** *Begomovirus*, *Curtovirus*, análise molecular

51

52

## 53 **Abstract**

54 The geminivirus (*Geminiviridae* family) are a diverse group of viruses that have  
55 genome composed of single stranded DNA (ssDNA) encapsidated in a circular twin  
56 icosahedral capsid. These virus are responsible for several economically significant  
57 diseases in cultures of all tropical and subtropical regions of the world. In an  
58 investigative research study of viruses that affect the cultivation of yams in northeastern  
59 Brazil, samples were collected in the states of Alagoas, Pernambuco and Paraíba, major  
60 domestic producers. Among the samples analyzed were found two possible new species

61 of geminivirus, a genus belonging to the begomovirus and one belonging to the genus  
62 *Curtovirus*. The begomovirus characterized showed identity of up to 87% with an  
63 isolate of *Tomato golden mosaic virus* (TGMV). The curtovirus present size of  
64 approximately 2.9 kb and high identity (> 90%) with *Beet severe curly top virus*  
65 (BSCTV) described in the sugar beet crop. The incidence and economic importance of  
66 these new diseases to be determined under the Northeast conditions as well as their  
67 mode of transmission and possible alternative hosts. The relationship of these species is  
68 consistent with the evolutionary events related to the family Geminiviridae, where  
69 curtovirus arose from recombination between *Mastrevirus* and *Begomovirus* Genus.  
70 This is the beginning of a study of great importance for the evolution of geminivirus in  
71 Brazil, since the sequencing of other clones and biological confirmations are still being  
72 held.

73

74 **Keywords:** *Begomovirus*, *Curtovirus*, molecular analysis

75

76

## 77 **Introdução**

78 O inhame é cultivado principalmente na Ásia, África, México, Caribe e na  
79 América do Sul, onde o Brasil é o maior produtor, com os principais campos de cultivo  
80 localizados na região Nordeste, especialmente nos estados da Paraíba, Pernambuco e  
81 Alagoas (IBGE, 2006).

82 Essa cultura é suscetível a uma variedade de pragas e doenças durante o  
83 crescimento, bem como pós-colheita e as viroses têm se destacado pela frequência com  
84 que ocorrem nos plantios comerciais (Hughes et al., 1997). Dentre as viroses descritas  
85 na cultura do inhame merecem destaque aquelas ocasionadas por *Potyvirus* (Família  
86 *Potyviridae*), particularmente *Yam mosaic virus* (YMV) e *Yam mild mosaic virus*  
87 (YMMV) (Thouvenel; Fauquet, 1979; Aleman-Verdaguer et al., 1997; Odu et al.,  
88 2001). Outro grupo de vírus importante para o inhame são os do gênero *Badnavirus*,  
89 Família *Caulimoviridae*. Este gênero é caracterizado por espécies com vírions  
90 baciliformes não-envelopados com 95-130 nm de comprimento e 24-35 nm de largura  
91 (Fauquet et al., 2005), contendo uma molécula de dsDNA com cerca de 7200-7600pb  
92 que forma um círculo aberto interrompido por descontinuidades sítio-específicas  
93 (Medberry et al., 1990). *Dioscorea alata bacilliforme virus* (DaBV) é o badnavírus

94 considerado mais importante e de maior distribuição geográfica (Phillips et al., 1999;  
95 Eni et al., 2008; Kenyon et al., 2008).

96 O inhame é propagado vegetativamente por túberas-semente ou seção de  
97 túberas, o que resulta no acúmulo e perpetuação de vírus durante cultivos sucessivos  
98 (Kenyon et al., 2008; Asiedu, 2010). A frequente presença de infecções mistas aliada a  
99 uma alta variabilidade genética dos vírus presentes no material propagativo de inhame  
100 tem dificultado o diagnóstico seguro das doenças que incidem sobre essa cultura. A  
101 diagnose de viroses de inhame tem se baseado principalmente em métodos de  
102 imunodeteção e na amplificação de sequências genômicas por reação em cadeia da  
103 polimerase (PCR) ou na combinação destes métodos (Phillips et al., 1999; Yang et al.,  
104 2003; Eni et al., 2008; Kenyon et al., 2008). No entanto, como estes métodos são  
105 dependentes de sequência eles priorizam identificação de vírus conhecidos previamente  
106 por infectar esta cultura deixando escapar à detecção novas espécies e variantes  
107 ocorrendo nos cultivos.

108 Inoue-Nagata et al. (2004) desenvolveram um método simples de clonagem que  
109 se fundamenta na amplificação por círculo rolante (RCA- rolling-circle amplification)  
110 pela polimerase do bacteriófago Phi29, seguida de digestão com enzima de restrição e  
111 ligação ao vetor. A utilização desta técnica tem permitido o estudo sobre a diversidade  
112 de espécies, variabilidade genética e epidemiologia de vírus com genoma de DNA  
113 circular numa variedade de culturas como tomate, soja, batata-doce, algodão e banana  
114 (Castillo-Urquiza et al., 2008; Fernandes et al., 2010; Paprotka et al., 2010; Kumar et  
115 al., 2010; James et al., 2011).

116 No presente trabalho, RCA foi utilizada para verificar a ocorrência de outros  
117 vírus de DNA circular, além dos badnavírus, em cultivos comerciais de inhame no  
118 Nordeste brasileiro. Duas espécies de geminivírus, uma pertencente ao gênero  
119 *Begomovirus* e a outra ao gênero *Curtovirus* foram encontradas infectando o inhame. Os  
120 geminivírus são membros da família *Geminiviridae* a qual apresentam genoma  
121 composto de DNA de fita simples (ssDNA) circular encapsidado em um capsídeo  
122 icosaédrico geminado. A família é constituída pelos gêneros *Mastrevirus*, *Curtovirus*,  
123 *Topocuvirus* e *Begomovirus*, definidos com base no tipo de inseto vetor, gama de  
124 hospedeiros e organização genômica (Stanley et al., 2005).

125 O gênero *Begomovirus* engloba espécies com um ou dois componentes  
126 genômicos, transmitidas pela mosca-branca *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae) a  
127 plantas dicotiledôneas (Stanley et al., 2005). Begomovírus constituem um dos mais

128 economicamente importantes grupos de fitovírus devido à alta incidência e severidade  
129 de doenças que causam em várias culturas através das regiões tropicais e subtropicais do  
130 Mundo (Briddon et al., 2001). No Brasil, as culturas do feijão e tomate são as mais  
131 afetadas (Faria e Maxwell, 1999; Zerbini et al., 2005). Em feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*  
132 L. e *P. lunatus* L.), o *Bean golden mosaic virus* (BGMV) causa o mosaico dourado, que  
133 tem sido uma importante doença desde 1970, e sua disseminação tem sido atribuída ao  
134 aumento das áreas de cultivo de soja (Costa, 1976). Já em tomate, a emergência de  
135 doenças causadas por begomovírus tem sido associada à introdução do biótipo B de *B.*  
136 *tabaci* em meados de 1990 (Ribeiro, 1998; Ribeiro et al., 2003). Dentre os begomovírus  
137 de maior importância econômica estão o *Bean golden mosaic virus* (BGMV), o *Tomato*  
138 *yellow leaf curl virus* (TYLCV) e o *African cassava mosaic virus* (ACMV).

139 No gênero *Curtovirus* estão os geminivírus com um único componente  
140 genômico, transmitidos por diversas cigarrinhas (Homoptera: Cicadellidae) a plantas  
141 dicotiledôneas. (Stanley et al., 2005). Sete espécies constituem este gênero *Beet curly*  
142 *top virus* (BCTV), *Beet severe curly top virus* (BSCTV), *Beet mild curly top virus*  
143 (BCMV), *Pepper yellow dwarf virus* (PeYDV), *Spinach curly top virus* (SCTV), *Beet*  
144 *curly top Iran Virus* (BCTIV) e *Horsehadish curly top virus* (HrCTV). Estas causam  
145 doenças denominadas “curly top disease” que estão amplamente disseminadas nos  
146 Estados Unidos e México ocorrendo em beterraba, espinafre, feijão, pimenta, pimentão  
147 e tomate (Chen et al., 2008).

148 Apesar dos inúmeros relatos de geminivírus infectando plantas cultivadas e  
149 invasoras no Brasil, este constitui o primeiro relato de infecção natural por begomovírus  
150 e curtovírus em monocotiledôneas. A caracterização desses isolados poderá trazer  
151 importantes informações sobre aspectos ecológicos e evolutivos a respeito dos  
152 geminivírus. Poderá também contribuir para determinar a prevalência e a importância  
153 econômica desses vírus na cultura do inhame.

154

## 155 **Material e métodos**

156

### 157 **Obtenção do material vegetal**

158

159 Para investigar a ocorrência de viroses com genoma de DNA circular em inhame  
160 no Nordeste brasileiro, foram coletadas 55 amostras de folhas com sintomas típicos de



161 viroses nos municípios de Viçosa, Arapiraca e Chã Preta-AL, Bonito-PE e Alhandra-PB  
162 (Figura 1), no ano de 2010. As amostras foram armazenadas a -80°C até o momento das  
163 análises.

164

### 165 **Extração de DNA e clonagem**

166 O DNA total de 55 amostras (11 de cada área amostrada escolhidas com base na  
167 sintomatologia) foi extraído como descrito por (Doyle & Doyle, 1987). Os genomas  
168 virais foram amplificados por círculo rolante utilizando a enzima Phi 29 (Inoue-Nagata,  
169 2004). Após amplificação, foi realizada a monomerização do concatâmero com as  
170 enzimas de restrição: *Kpn* I, *Xho* I e *BamH* I. As amostras que apresentaram padrão de  
171 restrição com bandas acima de 2 kb foram selecionadas para a clonagem em  
172 pBLUESCRIPT KS+ (Stratagene). Os plasmídeos recombinantes foram identificados  
173 por análise de restrição, e os insertos virais foram sequenciados pela Macrogen, Inc.  
174 (Seoul, Coréia do Sul).

175

### 176 **Comparação de sequências e análise filogenética**

177

178 As sequências de nucleotídeos obtidas foram inicialmente submetidas a uma  
179 pesquisa BLAST para a atribuição preliminar das espécies com base nos critérios  
180 estabelecidos pelo ICTV (Fauquet et al., 2008). Comparações dois a dois das sequências  
181 de nucleotídeos foram feitas com DNAMAN versão 4.0. utilizando a opção de  
182 alinhamento ideal. As sequências de nucleotídeos desse estudo foram alinhadas  
183 utilizando o módulo Muscle no programa Mega 5.0 (Tamura, 2007) com outras  
184 sequências depositadas no Genbank (Tabela 1). Análises de máxima verossimilhança  
185 foram feitas usando estratégia heurística de busca no PAUP\* versão 4.0b10. ModelTest  
186 versão 3.07 (Posada; Crandall, 1998) foi usado para determinar o melhor ajuste do  
187 modelo de substituição de DNA para uso nas análises de probabilidade para cada região,  
188 selecionando um modelo baseado no Critério de Informação Akaike.

189 A análise filogenética para begomovirus foi realizada utilizando inferência  
190 Bayesiana e cadeia de Markov Monte Carlo implementadas em MrBayes versão 3.0. A  
191 mesma inferência foi realizada sobre os dados alinhados definido depois que o modelo  
192 de substituição de nucleotídeos foi determinada por Mr. Modeltest v. 2.2 (Nylander,  
193 2004). O programa ModelTest 3.7 foi usado para prever o modelo de melhor ajuste  
194 GTR+I+G. A simulação MCMC para 20 milhões de gerações e amostrados a cada 1000

195 passos. A convergência foi avaliada com base no tamanho de amostragem eficaz após  
196 os 25% burn-in usando Tracer versão 1.5. As árvores foram visualizados utilizando o  
197 programa FigTree versão 1.3.1 e editados usando o Corel Draw X3.

198

## 199 **Resultados**

200

201 Das 55 amostras avaliadas foram obtidos 16 clones como mostra a Tabela 2.  
202 Destes, 9 corresponderam a vírus do gênero *Begomovirus*, e as identidades variaram  
203 entre 81-100% comparados com sequências depositadas no Genbank. O clone 7VK1  
204 (DNA-A) apresentou <87% de identidade com todos os begomovírus mais relacionadas  
205 já descritas anteriormente depositadas no Genbank (Figura 2).

206 O isolado 7VK1 apresentou uma típica organização genômica dos begomovirus  
207 bipartidos do Novo Mundo, com cinco ORFs. A comparação par a par de cada ORF do  
208 DNA-A indica que a ORF da proteína capsidial (CP) é a mais conservada com 77-92%  
209 de identidade, e a Rep como a menos conservada com <68% de identidade.

210 O DNA-A tem o nonanucleotídeo conservado (5'TAATATTAC3') como parte  
211 de uma estrutura em forma de grampo na origem de replicação. A análise filogenética  
212 baseada no DNA-A e incluindo os begomovirus das Américas colocou o 7VK1 em um  
213 ramo com duas espécies de begomovirus que infectam tomateiro do Brasil *Tomato*  
214 *golden mosaic virus* (TGMV) e *Tomato yellow vein streak virus* (ToYVSV) (Figura 3).

215 O clone 30VK1 foi identificado como pertencente ao gênero *Curtovirus*. Esse  
216 clone possui aproximadamente 2,9 kb com 97% de identidade com um isolado de *Beet*  
217 *mild curly top virus* depositado no Genbank (Acesso: AY134867). Esse dado foi  
218 confirmado com a análise filogenética que agrupou o 30VK1 com o (BMCTV).

219

## 220 **Discussão**

221 Este é o primeiro relato de geminivírus infectando plantas de inhame no mundo.  
222 A espécie viral representada pelo isolado 7VK1 poderia ser membro de uma linhagem  
223 distinta de begomovírus do Novo Mundo, detectado em monocotiledôneas.

224 Análises filogenéticas com base nas sequências do DNA-A de begomovírus das  
225 Américas mostrou que a espécie detectada neste trabalho agrupa com os vírus  
226 brasileiros. Pesquisas realizadas nos últimos cinco anos (Castillo-Urquiza et al., 2010;  
227 Cotrim et al., 2007; Fernandes et al., 2008) indicam que certas espécies tornaram-se

228 predominantes em diferentes regiões do país. No entanto, Castillo-Urquiza et al. (2008)  
229 relataram recentemente seis novas espécies de begomovírus de tomate e ervas daninhas,  
230 indicando que novas espécies continuam a surgir.

231 Os begomovírus já detectadas no Brasil são típicas do novo mundo, com  
232 genomas bipartidos os quais resultam de dois grupos monofiléticos, um contendo as  
233 viroses encontradas em plantas invasoras, mas incluindo o ToYSV, e o outro contendo  
234 os vírus infectando plantas cultivadas (Andrade et al., 2006). ToYVSV e ToSRV tem  
235 sido predominantes em cultivo de tomate ao longo dos anos, sendo detectados na  
236 maioria das amostras coletadas em várias pesquisas (Fernandes et al., 2008; Ferreira et  
237 al., 2005).

238 Diversos fatores, incluindo a evolução de novas variantes do vírus, aparecimento  
239 de vetores eficientes, mudanças climáticas, mudanças nos sistemas de cultivo, o  
240 movimento de material de plantio infectado e introdução de variedades de plantas  
241 suscetíveis têm isoladamente, ou em conjunto, contribuído para o surgimento de  
242 problemas de geminivírus em todo o mundo. Os geminivírus podem ocorrer não só  
243 entre as variantes do mesmo vírus, mas também entre espécies e até mesmo entre  
244 gêneros, resultando em rápido desenvolvimento de novas formas. Consequentemente,  
245 os geminivírus podem, em breve, emergir como a família mais numerosa de vírus de  
246 plantas (Varma; Malathi, 2003). Sabe-se que os curtovírus podem ter evoluído através  
247 de algum evento de recombinação entre mastrevirus e begomovírus (Harrison &  
248 Robinson, 1999) e que recombinantes têm surgido entre curtovírus e begomovírus  
249 (Klute et al., 1996) por isso, a recombinação genômica deve ter desempenhado um  
250 papel importante na evolução e surgimento de novos geminivírus.

251 A grande diversidade de espécies de begomovírus encontrada no Brasil está  
252 associada à introdução, disseminação e alta polifagia do biótipo B de *B. tabaci* (Ribeiro  
253 et al., 2007). Acredita-se que o surgimento de novas espécies de begomovírus, seja  
254 resultado da transferência horizontal de vírus nativos que infectam hospedeiras  
255 selvagens ou plantas daninhas pelo biótipo B. de *B. tabaci*. Uma vez presentes na nova  
256 hospedeira, esses vírus nativos evoluem rapidamente via recombinação e  
257 pseudorecombinação, dando origem às novas espécies detectadas atualmente no campo  
258 (Castillo-Urquiza et al., 2008). Begomovírus recombinantes têm sido diretamente  
259 implicados na emergência de novas doenças e epidemias em plantas cultivadas em  
260 muitos países (Pita et al, 2001; Monci et al, 2002; Garcia-Andres et al., 2006; Garcia-  
261 Andres et al., 2007; Lefeuvre et al., 2010). Estudos sugerem que a recombinação é uma

262 fonte comum e importante de geração de diversidade genética em begomovírus  
263 brasileiros (Galvão et al., 2003; Inoue-Nagata et al., 2006; Ribeiro et al., 2007; Ramos-  
264 Sobrinho et al., 2010; Silva et al., 2011).

265 Em contraste ao cenário encontrado para o begomovírus, doenças relacionadas à  
266 infecção por curtovírus em plantas cultivadas no país até então não tinham sido  
267 documentadas. Porém existe relato de infecções associadas a curtovírus em outros  
268 países da América do Sul, como Argentina, Bolívia e Uruguai. O curtovírus obtido a  
269 partir do clone 30VK1 proveniente de *Dioscorea alata* no município de Viçosa-AL é  
270 altamente relacionado com o isolado de BMCTV-Worland4 (NC\_004753). Estudos  
271 revelaram que BMCTV encontra-se amplamente disseminada em beterraba e pimentão  
272 nos Estados Unidos e México (Strausbaugh et al., 2008; Chen et al., 2008). Epidemias  
273 de “curly top disease” em pimentão ocorrendo no México estão relacionadas com o  
274 surgimento de um isolado altamente divergente dessa espécie, o BMXP24 (Chen et al.,  
275 2011).

276 A infecção natural de plantas monocotiledôneas por vírus pertencentes aos  
277 gêneros *Begomovirus* e *Curtovirus* não era conhecida até então. No entanto, acredita-se  
278 que o evento tenha ocorrido no Brasil em consequência do tipo de reprodução da planta  
279 hospedeira. Como o inhame é propagado vegetativamente, esses vírus teriam chegado  
280 ao país por meio de troca internacional de germoplasma infectado. Duas evidências  
281 suportam esta hipótese. A primeira é a inexistência de registro sobre a ocorrência de  
282 cigarrinha *Circulifer tenellus* (Baker) (Homoptera: Cicadellidae), vetor de BMCTV no  
283 Brasil. Esta evidência reforça o fato da ausência de viroses associadas à curtovírus no  
284 país. A segunda, é que apesar do relato de altos níveis populacionais do Biótipo B de *B.*  
285 tabaci sobre hortaliças, frutas e plantas daninhas, inhame não é hospedeira desse vetor  
286 (Haji et al., 1999). De fato, não foi encontrada correlação entre plantas sintomáticas de  
287 inhame e presença de mosca-branca durante a coleta das amostras.

288 Contudo, isso não exclui o fato de ter ocorrido falha em detectar infecções  
289 ocasionadas por begomovírus e curtovírus no caso de co-infecção com outras viroses  
290 nessa hospedeira, uma vez que sintomas causados por diferentes grupos vírus podem ser  
291 indistinguíveis. Infecções mistas entre diferentes grupos de vírus são assumidas ocorrer  
292 com frequência em inhame (Kenyon et al., 2008, Eni et al., 2008). Os padrões de bandas  
293 gerados a partir da digestão dos produtos de RCA com algumas endonucleases de  
294 restrição utilizadas nesse estudo sugerem que infecções mistas entre o curtovírus e o  
295 begomovírus obtidos de inhame também parece ser um evento comum (Dados não

296 mostrados). No entanto, a co-infecção entre as espécies desses dois diferentes gêneros de  
297 geminivírus em uma única planta não foi confirmada.

298 A recombinação intergenérica é um dos fatores que refletem a atual estrutura  
299 taxonômica encontrada para família *Geminiviridae* (Rybicki, 1994). O cenário evolutivo  
300 proposto para esta família sugere que os curtovírus surgiram a partir de eventos de  
301 recombinação entre um geminivírus ancestral (monosegmentado) transmitido por  
302 mosca-branca e um mastrevírus ancestral transmitido por cigarrinha. Um evento similar  
303 teria dado origem a única espécie do gênero *Topocuvirus* (Nawaz-Ul-Rehman et al.,  
304 2009).

305 Recentemente foi comprovada a co-infecção por geminivírus pertencentes a dois  
306 gêneros distintos, *Begomovirus* e *Mastrevirus* na planta daninha *Xanthium strumarium*,  
307 confirmando que de fato o pré-requisito para ocorrência de recombinação intergenérica  
308 existe. Além disso, esses resultados indicam que o evento de recombinação que ocorreu  
309 entre este dois gêneros milhões de anos atrás pode ter de fato ocorrido. Tem sido  
310 observado o surgimento de número crescente de espécies atípicas de vírus que não se  
311 encaixa em quaisquer dos quatro gêneros atualmente descritos da família  
312 *Geminiviridae* (Yazdi et al., 2008; Varsani et al., 2009; Briddon et al., 2010).

313 Evidências sugerem que a *Horseradish curly top virus*, surgiu de uma  
314 recombinação intergenérica entre um curtovírus e uma linhagem de begomovírus apenas  
315 conhecida ocorrer no Novo Mundo (Stanley; Latham, 1992). *Eragrostis curvula streak*  
316 *virus* (ECSV) foi encontrado infectando uma monocotiledônea na África do Sul, esta  
317 espécie representa uma linhagem altamente divergente de begomovírus que compartilha  
318 características entre outros três gêneros de *Geminiviridae* (Varsani et al., 2009).

319 O mais recente relato é da espécie Turnip curly top virus (TCVC) causando  
320 infecção em nabo no Irã. Esta espécie apresenta genes no sentido viral correspondentes  
321 àquelas encontradas nos begomovírus, porém os genes senso-complementar são  
322 característicos de curtovírus. Outro fato interessante é que *Mastrevirus* ocorrem no  
323 Novo Mundo e a maioria de suas espécies infecta monocotiledôneas. Portanto, a  
324 presença de mastrevírus em plantas dicotiledôneas, tem sido descrita, estes incluem  
325 Chickpea chlorotic dwarf Pakistan virus (CpCDPV) identificada no Paquistão e Bean  
326 yellow dwarf virus (BeYDV) a qual ocorre tanto na Pasquistão como na África do Sul  
327 (Halley-Stott et al., 2007).

328 Eventos de recombinação podem implicar na evolução e epidemiologia de vírus  
329 de planta, e isto pode afetar características patogênicas e de adaptação aos novos

330 hospedeiros (Pita et al., 2001; Monci et al., 2002). A presença de espécies  
331 recombinantes no campo tem sido relacionada ao surgimento de surtos epidêmicos,  
332 como por exemplo, a presença do isolado de BMCTV-MXP24 está associada à  
333 epidemia de “curly top disease” no México (Chen et al., 2011). Adicionalmente foi  
334 mostrado que essa mesma espécie é capaz de infectar naturalmente curcubitáceas (Chen  
335 et al., 2009). Os eventos de recombinação que deram origem ao TPCV permitiram a  
336 aquisição do mesmo por um novo vetor, *Circulifer hematoceps* (Heydarnejad et al.,  
337 2007), em adição a *C. tenellus*.

338 A técnica de RCA tem sido empregada na diagnose e caracterização molecular  
339 de um grande número de espécies pertencentes às famílias *Geminiviridae*, *Nanoviridae*  
340 e *Caulimoviridae*, devido sua capacidade de detectar moléculas de DNA circular mesmo  
341 sem qualquer informação prévia sobre a sequência do vírus (Inoue-Nagata et al., 2004;  
342 Haible et al., 2006; Gronenborn, 2004; Castillo-Urquiza et al., 2008; Paprotka et al.,  
343 2010; Silva et al., 2011; Kumar et al., 2010). Nesse estudo, esta técnica foi utilizada  
344 para investigar a ocorrência de vírus de DNA circular em cultivos comerciais de inhame  
345 no nordeste do Brasil.

346 Assim, as pesquisas sobre ocorrência de doenças causadas por geminivírus em  
347 culturas brasileiras pode trazer informações de grande importância de ordem econômica  
348 e da distribuição desse grupo de vírus no Brasil. Análises adicionais, incluindo a  
349 detecção de recombinação e genealogia de genes, bem como testes biológicos para  
350 confirmação da replicação do vírus em plantas de inhame serão realizadas a fim de  
351 determinar a estrutura genética destes novos isolados virais de begomovírus e curtovírus  
352 nessa cultura.

353

#### 354 **Agradecimentos**

355 A primeira autora agradece a CAPES e a FAPEAL pela concessão da bolsa de estudos e  
356 pelo auxílio mobilidade discente fornecido para a realização dos trabalhos nas  
357 instituições parceiras.

358

#### 359 **Referências bibliográficas**

360 Aleman ME, Marcos JF, Brugidou C, Beachy RN, Fauquet C (1997) Analysis of the  
361 sequence diversity of the P1, HC, P3, NIb and CP genomic regions of several yam

- 362 mosaic potyvirus isolates: implications for the intraspecies molecular diversity of  
363 potyviruses. *Journal of General Virology* 78:1253-1264.
- 364 Andrade EC, Manhani GG, Alfenas P, Calegario RF, Fontes EPB, Zerbini FM (2006)  
365 Tomato yellow spot virus, a tomato-infecting begomovirus from Brazil with a closer  
366 relationship to viruses from *Sida* sp., forms pseudorecombinants with begomoviruses  
367 from tomato but not from *Sida*. *Journal of General Virology* 87:3687-3696.
- 368 Asiedu R, Sartie A (2010) Crops that feed the World 1. Yams: Yams for income and  
369 foodsecurity. *Food Security* 2:305-315.
- 370 Briddon RW, Heydarnejad J, Khosrowfar F, Massumi H, Martin DP, Varsani A (2010).  
371 Turnip curly top virus, a highly divergent geminivirus infecting turnip in Iran. *Virus*  
372 *Research* 152:169-175.
- 373 Briddon RW, Mansoor S, Bedford ID, Pinner MS, Saunders K, Stanley J, Zafar Y,  
374 Malik KA, Markham PG (2001) Identification of DNA components required for  
375 induction of cotton leaf curl disease. *Virology* 285:234-243.
- 376 Castillo-Urquiza G. P. (2008) Diversidade e estrutura genética de begomovírus em duas  
377 regiões produtoras de tomate do Sudeste do Brasil. (Tese D.S.). Dep. de Fitopatologia,  
378 Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG. 107 p.
- 379 Castillo-Urquiza GP, Alfenas-Zerbini P, Beserra-Junior JEA, Mizubuti ESG, Varsani A,  
380 Martin DP, Zerbini FM (2010) Genetic structure of tomato-infecting begomovirus  
381 populations in two tomato-growing regions of Southeastern Brazil. Program and  
382 Abstracts, 6th International Geminivirus Symposium and 4th International ssDNA  
383 Comparative Virology Workshop. Guanajuato, Mexico.
- 384 Castillo-Urquiza GP, Beserra JrJEA, Bruckner FP, Lima ATM, Varsani A, Alfenas-  
385 Zerbini P, Zerbini FM (2008) Six novel begomoviruses infecting tomato and associated  
386 weeds in Southeastern Brazil. *Archives of Virology* 153:1985-1989.
- 387 Chen L-F, Gilbertson, RL (2008) Beet mild curly top virus. In: Rao GP, Paul  
388 Khurana,S.M., Lenardon, S. (Eds.) Characterization, diagnosis & management of plant  
389 viruses. Texas. Studium Press LLC. pp. 195–215.
- 390 Chen L-F, Rojas M, Kon T, Gamby K, Xoconostle-Cazares B, Gilbertson RL (2009) A  
391 severe symptom phenotype in tomato in Mali is caused by a reassortant between a novel  
392 recombinant begomovirus (Tomato yellow leaf curl Mali virus) and a betasatellite.  
393 *Molecular Plant Pathology* 10:415-430.

- 394 Chen L-F, Vivoda E, Gilbertson R L (2011) Genetic diversity in curtoviruses: a highly  
395 divergent strain of Beet mild curly top virus associated with an outbreak of curly top  
396 disease in pepper in Mexico. *Archives Virology* 156:547–555.
- 397 Costa AS (1976) Whitefly-transmitted plant diseases. *Annual Review of*  
398 *Phytopathology* 14:429-440.
- 399 Cotrim MA, Krause-Sakate R, Narita N, Zerbini FM, Pavan MA (2007) Diversidade  
400 genética de begomovírus em cultivos de tomateiro no Centro-Oeste Paulista. *Summa*  
401 *Phytopathologica* 33:300-303.
- 402 Doyle JJ, Doyle JL (1987) A rapid DNA isolation procedure for small amounts of fresh  
403 leaf tissue. *Phytochemical Bulletin* 19:11-15.
- 404 Eni AO, Hughes Jd'A, Rey MEC (2008) Survey of the incidence and distribution of  
405 five viruses infecting yams in the major yam-producing zones in Benin. *Annals of*  
406 *Applied Biology* 153:223–232.
- 407 Faria JC, Maxwell DP (1999) Variability in geminivirus isolates associated with  
408 *Phaseolus* spp. in Brazil. *Phytopathology* 89:262-268.
- 409 Fauquet C, Mayo M, Maniloff J, Desselberger U, Ball L (2005) Virus taxonomy. Eight  
410 Report of the International committee on Taxonomy of Viruses. Amsterdam. Elsevier  
411 Academic Press.
- 412 Fauquet CM, Bridson R W, Brown JK, Moriones E, Stanley J, Zerbini FM, Zhou X  
413 (2008) Geminivirus strain demarcation and nomenclature. *Archives of Virology*  
414 153:783-821.
- 415 Fernandes FR, Albuquerque LC, Giordano LB, Boiteux LS, Ávila AC, Inoue- Nagata  
416 AK (2008) Diversity and prevalence of Brazilian bipartite begomovirus species  
417 associated to tomatoes. *Virus Genes* 36:251-258.
- 418 Fernandes FR, de Albuquerque LC, Inoue-Nagata AK (2010) Development of a  
419 species-specific detection method for three Brazilian tomato begomoviruses. *Tropical*  
420 *Plant Pathology* 35:43-47.
- 421 Ferreira SS, Alfenas PF, Lima ATM, Barros DR, Senna L, Zerbini FM (2005) Detecção  
422 de begomovírus em tomateiro no município de Paty de Alferes, Rio de Janeiro.  
423 *Fitopatologia Brasileira* 30:S183.
- 424 Galvão RM, Mariano AC, Luz DF, Alfenas PF, Andrade EC, Zerbini FM, Almeida MR,  
425 Fontes EPB (2003) A naturally occurring recombinant DNA-A of a typical bipartite  
426 begomovirus does not require the cognate DNA-B to infect *Nicotiana benthamiana*  
427 systemically. *Journal of General Virology* 84:715-726.



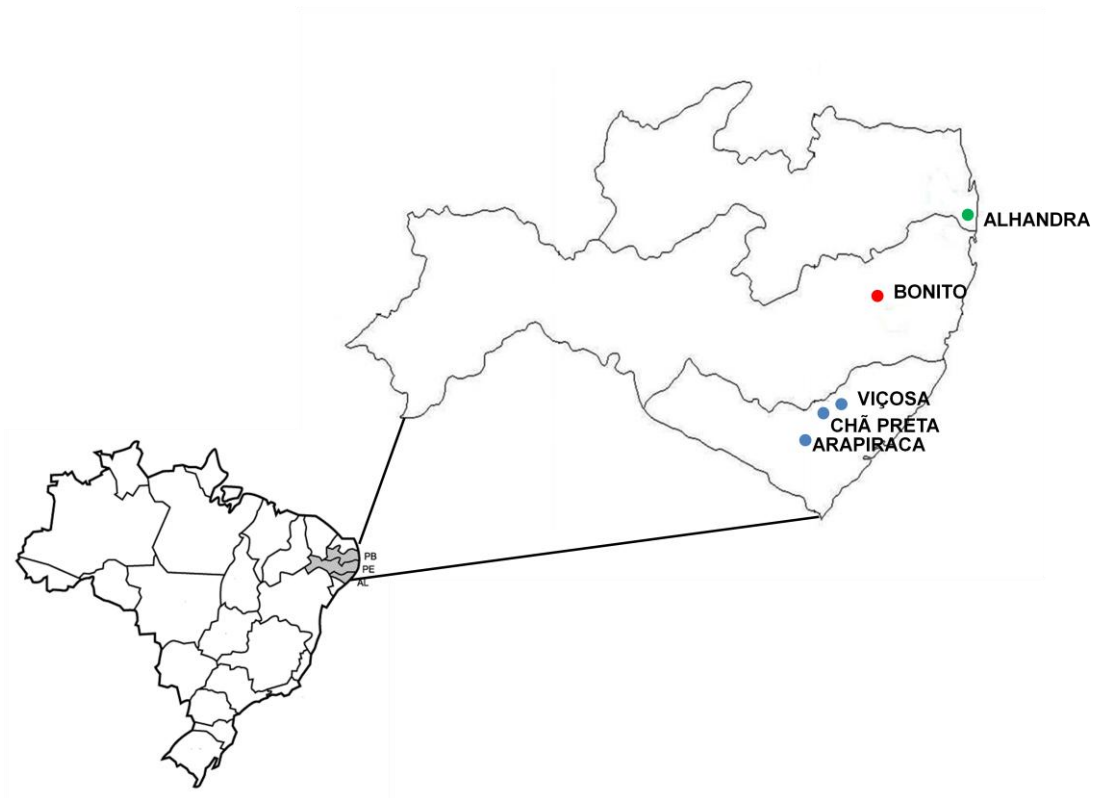
- 428 García-Andrés S, Monci F, Navas-Castillo J, Moriones E (2006) Begomovirus genetic  
429 diversity in the native plant reservoir *Solanum nigrum*: Evidence for the presence of a  
430 new virus species of recombinant nature. *Virology* 350:433-442.
- 431 García-Andrés S, Tomas D M, Sanchez-Campos S, Navas-Castillo J, Moriones E  
432 (2007) Frequent occurrence of recombinants in mixed infections of tomato yellow leaf  
433 curl disease-associated begomoviruses. *Virology* 365:210-219.
- 434 Gronenborn B (2004) Nanoviruses: genome organisation and protein function.  
435 *Veterinary Microbiology* 98:103-109.
- 436 Haible D, Kober S, Jeske H (2006) Rolling circle amplification revolutionizes diagnosis  
437 and genomics of geminiviruses. *Journal of Virological Methods* 135:9-16.
- 438 Haji FNP, Lima MF, Mattos MA, Nunes AM, Alencar JA, Barbosa FR (1999)  
439 Levantamento de plantas hospedeiras de mosca-branca (*Bemisia* spp.) no Submédio do  
440 Vale São Francisco nos anos de 1996 a 1998. VIII Simpósio Latino-Americano e do  
441 Caribe sobre Moscas Brancas e Geminivírus. Recife, Brazil.
- 442 Halley-Stott RP, Tanzer F, Martin DP, Rybicki EP (2007) The complete nucleotide  
443 sequence of a mild strain of Bean yellow dwarf virus. *Arch Virol* 152:1237-1240.
- 444 Harrison BD, Robinson DJ (1999) Natural genomic and antigenic variation in white- fly  
445 transmitted geminiviruses (begomoviruses). *Annual Review of Phytopathology* 39:369-  
446 398.
- 447 Heydarnejad J, Hosseini Abhari E, Bolok Yazdi H, Massumi RH ( 2007) Curly Top  
448 of Cultivated Plants and Weeds and Report of a Unique Curtovirus from Iran. *Journal of*  
449 *Phytopathology* 155: 321-325.
- 450 Hughes J d'A, Dongo L, Atiri GI (1997) Viruses infecting cultivated yams (*Dioscorea*  
451 *alata* and *D. rotundata*) in Nigeria. *Phytopathology* 87:45.
- 452 IBGE (2006). Censo Agropecuário . Brasil. 777.
- 453 Inoue-Nagata AK, Albuquerque LC, Rocha WB, Nagata T (2004) A simple method for  
454 cloning the complete begomovirus genome using the bacteriophage phi 29 DNA  
455 polymerase. *Journal of Virological Methods* 116:209-211.
- 456 Inoue-Nagata AK, Martin DP, Boiteux LS, Giordano LD, Bezerra IC, de Avila AC  
457 (2006) New species emergence via recombination among isolates of the Brazilian  
458 tomato infecting Begomovirus complex. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 41:1329  
459 1332.

- 460 James AP, Geijskes RJ, Dale JL, Harding RM (2011) Development of a Novel Rolling-  
461 Circle Amplification Technique to Detect Banana streak virus that also Discriminates  
462 Between Integrated and Episomal Virus Sequences *Plant Disease* 95:57-62.
- 463 Kenyon L, Lebas BSM, Seal SE (2008) Yams (*Dioscorea* spp.) from the South Pacific  
464 Islands contain many novel badnaviruses: implications for international movement of  
465 yam germplasm. *Archives of Virology* 153:877-889.
- 466 Klute KA, Nadler SA, Stenger DC (1996) Horseradish curly top virus is a distinct  
467 subgroup II geminivirus species with rep and C4 genes derived from a subgroup III  
468 ancestor. *J Gen Virol* 77:1369-1378.
- 469 Kumar J, Kumar A, Roy JK, Tuli R, Khan JA (2010) Identification and molecular  
470 characterization of begomovirus and associated satellite DNA molecules infecting  
471 *Cyamopsis tetragonoloba*. *Virus Genes* 41:118-125.
- 472 Lefeuvre P, Martin DP, Harkins G, Lemey P, Gray AJA, Meredith S, Lakay F, Monjane  
473 A, Lett JM, Varsani A, Heydarnejad J (2010) The spread of tomato yellow leaf curl  
474 virus from the Middle East to the world. *PLoS Pathogens* 6: 1553-7366.
- 475 Medberry SL, Lockhart BEL, Olszewski NE (1990) Properties of Commelina yellow  
476 mottle virus complete DNA sequence, genomic discontinuities and transcript suggest  
477 that it is a pararetrovirus. *Nucleic Acids Research* 18:5505-5513.
- 478 Monci F, Sanchez-Campos S, Navas-Castillo J, Moriones E (2002) A natural  
479 recombinant between the geminiviruses Tomato yellow leaf curl Sardinia virus and  
480 Tomato yellow leaf curl virus exhibits a novel pathogenic phenotype and is becoming  
481 prevalent in Spanish populations. *Virology* 303:317-326.
- 482 Nawaz-Ul-Rehman MS, Fauquet CM (2009). Evolution of geminiviruses and their  
483 satellites. *Febs Letters* 583:1825-1832.
- 484 Nylander JAA, Ronquist F, Huelsenbeck JP, Nieves-Aldrey JL (2004) Bayesian  
485 phylogenetic analysis of combined data. *Systematic Biology* 53:47-67.
- 486 Odu BO, Hughes Jd'A, Asiedu R, Ng NQ, Shoyinka SA, Oladiran OA (2001) Yam  
487 viruses of Nigeria. 7th Triennial Symp. Int. Soc. Tropical Root Crop – African Branch.  
488 Cotonou, Benin.
- 489 Paprotka T, Boiteux LS, Fonseca MEN, Resende RO, Jeske H, Faria JC, Ribeiro SG  
490 (2010) Genomic diversity of sweet potato geminiviruses in a Brazilian germplasm bank.  
491 *Virus Research* 149:224-233.

- 492 Phillips SB, RW, Brunt A, Hull R (1999) The Partial Characterization of a Badnavirus  
493 Infecting the Greater Asiatic or Water Yam (*Dioscorea alata*). *Journal of*  
494 *Phytopathology* 147:265-269.
- 495 Pita JS, Fondong VN, Sangare A, Otim-Nape GW, Ogwal S, Fauquet CM (2001)  
496 Recombination, pseudorecombination and synergism of geminiviruses are determinant  
497 keys to the epidemic of severe cassava mosaic disease in Uganda. *Journal of General*  
498 *Virology* 82:655-665.
- 499 Posada D, Crandall KA (1998) MODELTEST: Testing the model of DNA substitution.  
500 *Bioinformatics* 14:817-818.
- 501 Ramos-Sobrinho R, Silva SJC, Silva TAL, Ribeiro SG, Lima GSA, Assunção IP,  
502 Zerbini FM (2010) Genetic structure of a population of the begomovirus Bean golden  
503 mosaic virus (BGMV) that infects lima bean (*Phaseolus lunatus* L.) in the state of  
504 Alagoas, Brazil. Program and Abstracts, 6th International Geminivirus Symposium and  
505 4<sup>th</sup> International ssDNA Comparative Virology Workshop. Guadalajara, México.
- 506 Ribeiro SG, Ambrozevicius LP, Ávila AC, Bezerra IC, Calegario RF, Fernandes JJ,  
507 Lima MF, Mello RN, Rocha H, Zerbini FM (2003) Distribution and genetic diversity of  
508 tomato-infecting begomoviruses in Brazil. *Archives of Virology* 148:281-295.
- 509 Ribeiro SG, Bezerra IC, Resende RO, Lima MF, Resende LV, Ávila AC (1998) New  
510 tomato geminiviruses in mixed infections in Brazil. 2nd International Workshop on  
511 Bemisia and Geminiviruses. San Juan, Porto Rico.
- 512 Ribeiro SG, Lohuis H, Goldbach R, Prins M (2007) Tomato chlorotic mottle virus is a  
513 target of RNA silencing but the presence of specific short interfering RNAs does not  
514 guarantee resistance in transgenic plants. *Journal of Virology* 81:1563-1573.
- 515 Rybicki EP (1994) A phylogenetic and evolutionary justification for three genera of  
516 Geminiviridae. *Archives of Virology* 139:49-77.
- 517 Silva SJC, Castillo-Urquiza GP, Hora-Júnior BT, Assunção IP, Lima GSA, Pio-Ribeiro  
518 G, Mizubuti ESG, Zerbini FM (2011) Species diversity, phylogeny and genetic  
519 variability of begomovirus populations infecting leguminous weeds in Northeastern  
520 Brazil. *Plant Pathology* in press:
- 521 Stanley J, Bisaro DM, Briddon RW, Brown JK, Fauquet CM, Harrison BD, Rybicki E  
522 P, Stenger DC (2005) Family Geminiviridae. In: Fauquet CM, Mayo MA, Maniloff J,  
523 Desselberger U, Ball LA (Eds.) *Virus Taxonomy*. Eighth Report of the International  
524 Committee on Taxonomy of Viruses. San Diego. Elsevier Academic Press.

- 525 Stanley J, Latham JR (1992) A symptom variant of beet curly top geminivirus produced  
526 by mutation of open reading frame C4. *Virology* 190:506-509.
- 527 Strausbaugh CA, Wintermantel WM, Gillen AM, Eujayl IA (2008) Curly Top Survey in  
528 the Western United States. *Phytopathology* 98:1212-1217.
- 529 Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S (2007) MEGA4: Molecular Evolutionary  
530 Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*  
531 24:1596-1599.
- 532 Thouvenel JC, Fauquet C (1979) Yam mosaic, a potyvirus infecting *Dioscorea*  
533 *cayenensis* in the Ivory Coast. *Annals of Applied Biology* 93:4.
- 534 Varma A, Malathi VG (2003) Emerging geminivirus problems: A serious threat to crop  
535 production. *Annals of Applied Biology* 142:145-164.
- 536 Varsani A, Shepherd DN, Dent K, Monjane AL, Rybicki EP, Martin DP (2009) A  
537 highly divergent South African geminivirus species illuminates the ancient evolutionary  
538 history of this family. *Virology Journal* 6:36.
- 539 Yang IC, Hafner GJ, Dale JL, Harding RM (2003) Genomic characterisation of taro  
540 bacilliform virus. *Archives of Virology* 148:937-949.
- 541 Yazdi HRB, Heydarnejad J, Massumi H (2008) Genome characterization and genetic  
542 diversity of beet curly top Iran virus: a geminivirus with a novel nonanucleotide. *Virus*  
543 *Genes* 36:539-545.
- 544 Zerbini FM, Alfenas PF, Andrade EC (2005) O silenciamento de RNA como um  
545 mecanismo de defesa de plantas a vírus. *Revisão Anual de Patologia de Plantas* 13:191 -  
546 246.
- 547
- 548
- 549
- 550
- 551
- 552
- 553
- 554

555



556

557 **Figura 1.** Mapa indicando os locais de coleta em áreas de cultivos de inhame  
558 (*Dioscorea* spp.) nos Estados de Paraíba (em verde), Pernambuco (em vermelho) e  
559 Alagoas (em azul).

560

561

562

563

564

565

566

567

568

**Tabela 1.** Isolados de begomovírus utilizados para comparação filogenética com os isolados obtidos de inhame.

569

<b>Vírus</b>	<b>Acrônimo</b>	<b>Accesso Genbank</b>
<i>Bean golden mosaic virus</i>	BGMV	M88686
<i>Blainvillea yellow spot virus</i>	BIYSV	EU710756
<i>Sida common mosaic virus</i>	SiCmMV	EU710751
<i>Sida mottle virus</i>	SiMoV	NC_004637
<i>Sida yellow leaf curl virus</i>	SiYLCV	EU710750
<i>Sida yellow mosaic virus</i>	SiYMV	NC_004639
<i>Tomato chlorotic mottle virus</i>	ToCMoV	AF490004
<i>Tomato common mosaic virus</i>	ToCmMV	NC_010835
<i>Tomato golden mosaic virus</i>	TGMV	NC_001507
<i>Tomato mild mosaic virus</i>	ToMIMV	EU710752
<i>Tomato rugose mosaic virus</i>	ToRMV	NC_002555
<i>Tomato severe rugose virus</i>	ToSRV	NC_009607
<i>Tomato yellow vein streak virus</i>	ToYVSV	NC_010949
<i>Abutilon mosaic virus</i>	AbMV	NC_001928
<i>Bean calico mosaic virus</i>	BCaMV	NC_003504

<i>Bean golden yellow mosaic virus</i>	BGYMV	NC_001439
<i>Macroptillium golden mosaic virus</i>	MaGMV	NC_010952
<i>Macroptillium mosaic Puerto Rico virus</i>	MaMPR	NC_004097
<i>Pepper golden mosaic virus</i>	PepGMV	NC_004101
<i>Pepper huasteco yellow vein virus</i>	PHYVV	NC_001359
<i>Potato yellow mosaic virus</i>	PYMV	NC_001934
<i>Sida golden mosaic Honduras virus</i>	SGMHV	NC_004659
<i>Sida golden yellow vein virus</i>	SiGYVV	NC_004635
<i>Sida yellow vein virus</i>	SiYVV	NC_004661
<i>Tomato mottle virus</i>	ToMoV	NC_001938
<i>Loofa yellow mosaic virus</i>	LYMV	AF509739
<i>Tomato severe leaf curl virus</i>	ToSLCV	NC_004642
<i>Mungbean yellow mosaic virus</i>	MYMV	D14703
<i>Tomato yellow leaf curl virus</i>	TYLCV	AJ489258
<i>Dicliptera yellow mottle virus</i>	DYMV	AF139168
<i>Tomato mild mosaic virus</i>	ToMIMV	EU710752
<i>Sida golden mosaic virus</i>	SGMV	AF049336
<i>Euphorbia mosaic virus</i>	EuMV	DQ318937

<i>Tomato leaf distortion virus</i>	ToLDV	EU710749
<i>Sida micrantha mosaic virus</i>	SimMV	AJ557451
<i>Sweet potato leaf curl virus</i>	SPLCV	AF104036
<i>Beet mild curly top virus</i>	BMCTV	AY 134867
<i>Beet severe curly top virus</i>	BSCTV	AY548948
<i>Beet mil curly top virus</i>	BMCTV	EU193175
<i>Beet mil curly top virus</i>	BMCTV	EU586261
<i>Pepper yellow dwarf virus</i>	PYDV	EU921828
<i>Beet severe curly top virus</i>	BSCTV	U02311
<i>Horseradish curly top virus</i>	HCTV	U49907
<i>Maize streak virus</i>	MSV	NC001346
<i>Tomato pseudo curly top virus</i>	TPCTV	NC003825

---

570

571

572

573

574

575

576

577

578

579

580



581 **Tabela 2.** Total de clones obtidos mediante rolling circle amplification (RCA) de  
582 amostras coletadas em diferentes municípios do Nordeste.

583

<b>Área coletada</b>	<b>Espécie de inhame</b>	<b><i>Begomovirus</i></b>	<b><i>Curtovirus</i></b>
Alhandra-PB	<i>D. alata</i>	0	0
Arapiraca-AL	<i>D. cayenensis</i>	5	0
Bonito-PE	<i>D. cayenensis</i>	0	0
Chã Preta-AL	<i>D. cayenensis</i>	0	0
Viçosa-AL	<i>D. cayenensis</i>	4	1

584

585

586

587

588

589

590

591

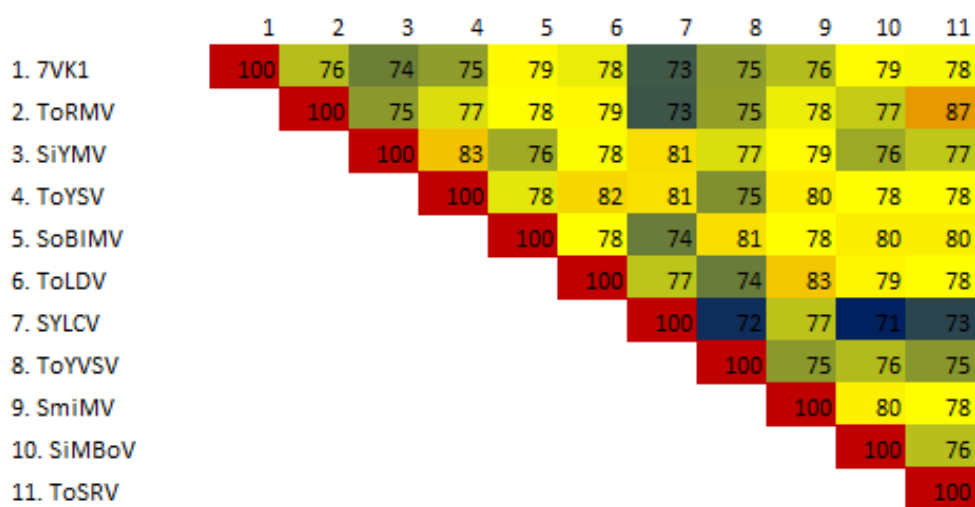
592

593

594

595

596



597

598



599

600 **Figura 2.** Porcentagem de identidade entre as sequências de nucleotídeo do DNA-A da  
 601 nova espécie de *Begomovirus* detectada no Brasil e sequências de vírus mais  
 602 relacionadas depositadas no GenBank.

603

604

605

606

607

608

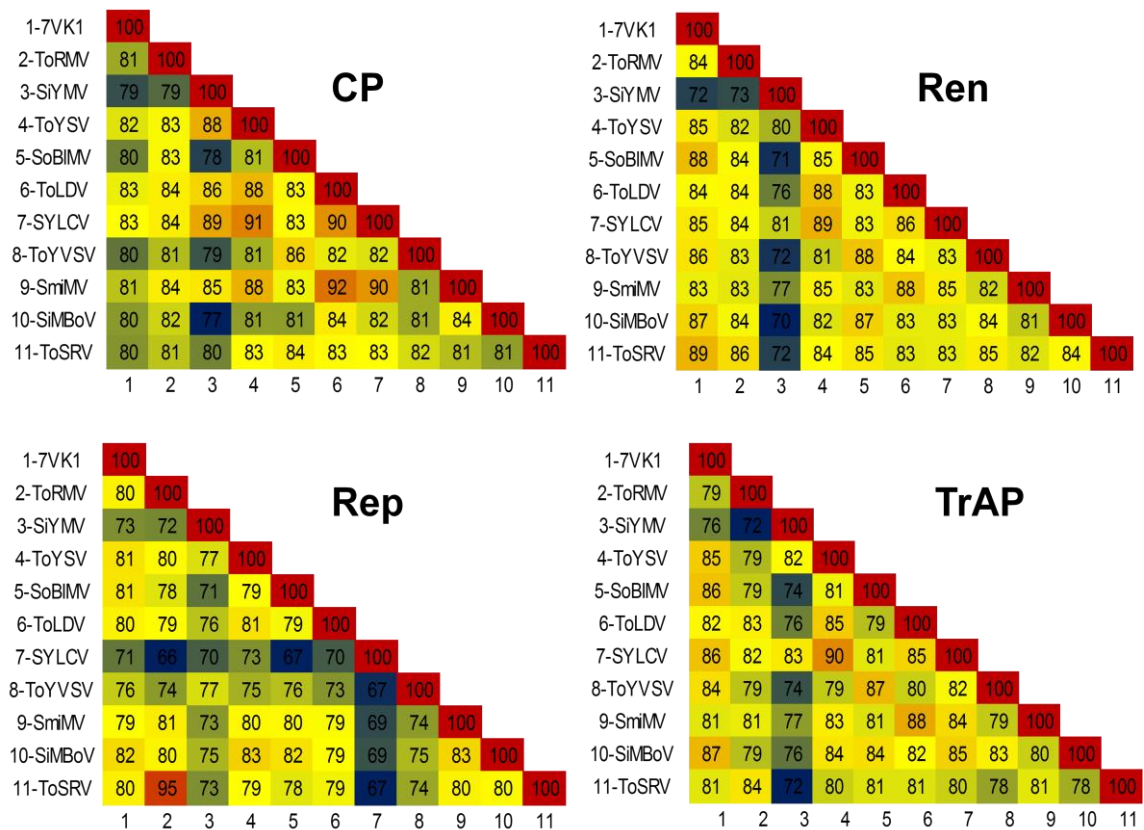
609

610

611

612

613



614

**Figura 3.** Porcentagem de identidade de sequência da CP, Rep, TrAP, e Ren do isolado 7VK1 e de isolados de begomovírus mais estreitamente relacionadas.

615

616

617

618

619

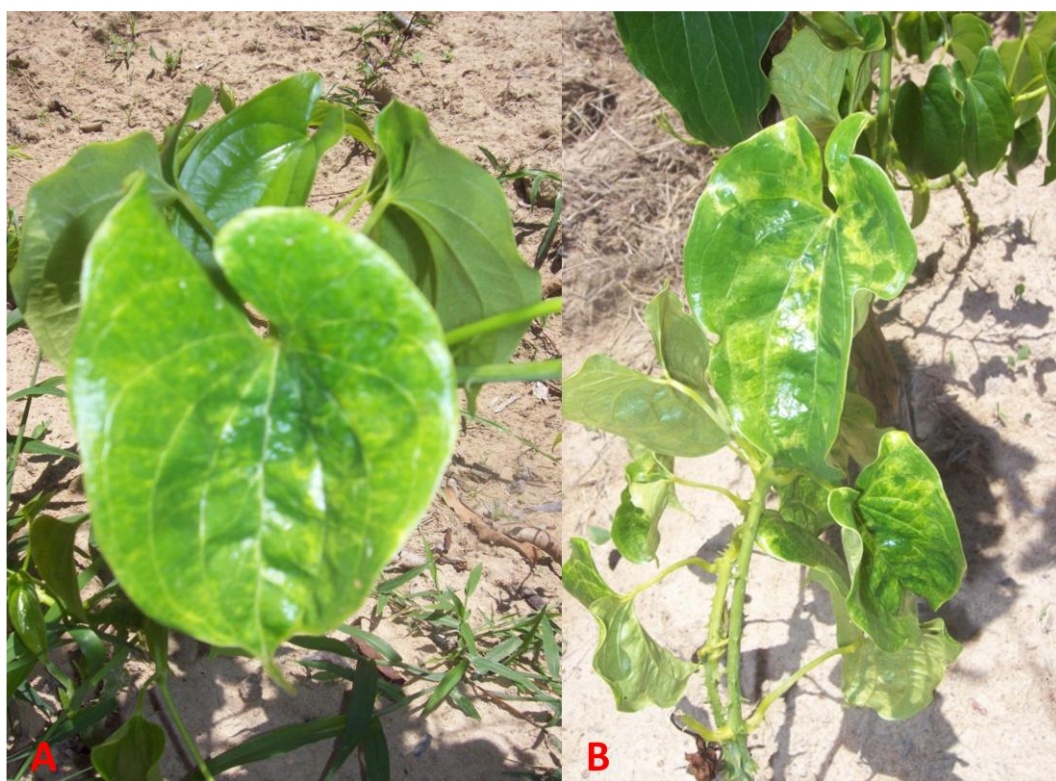
620

621

622

623

624



625

**Figura 4.** Plantas de inhame apresentando sintomas de virose no município de Viçosa-AL. A: mosaico e deformação foliar; B: mosaico severo.

626

627

628

629

630

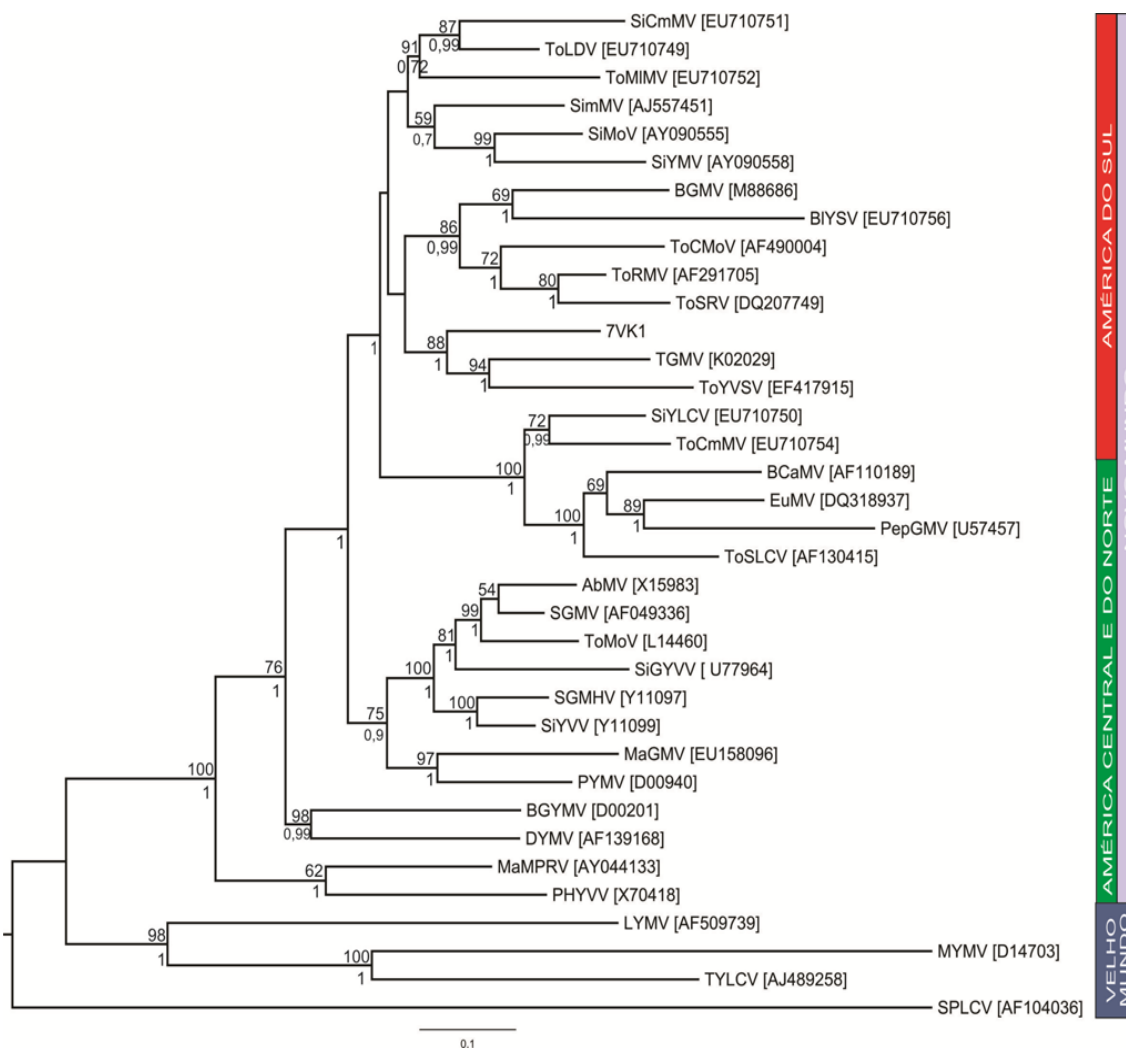
631

632

633

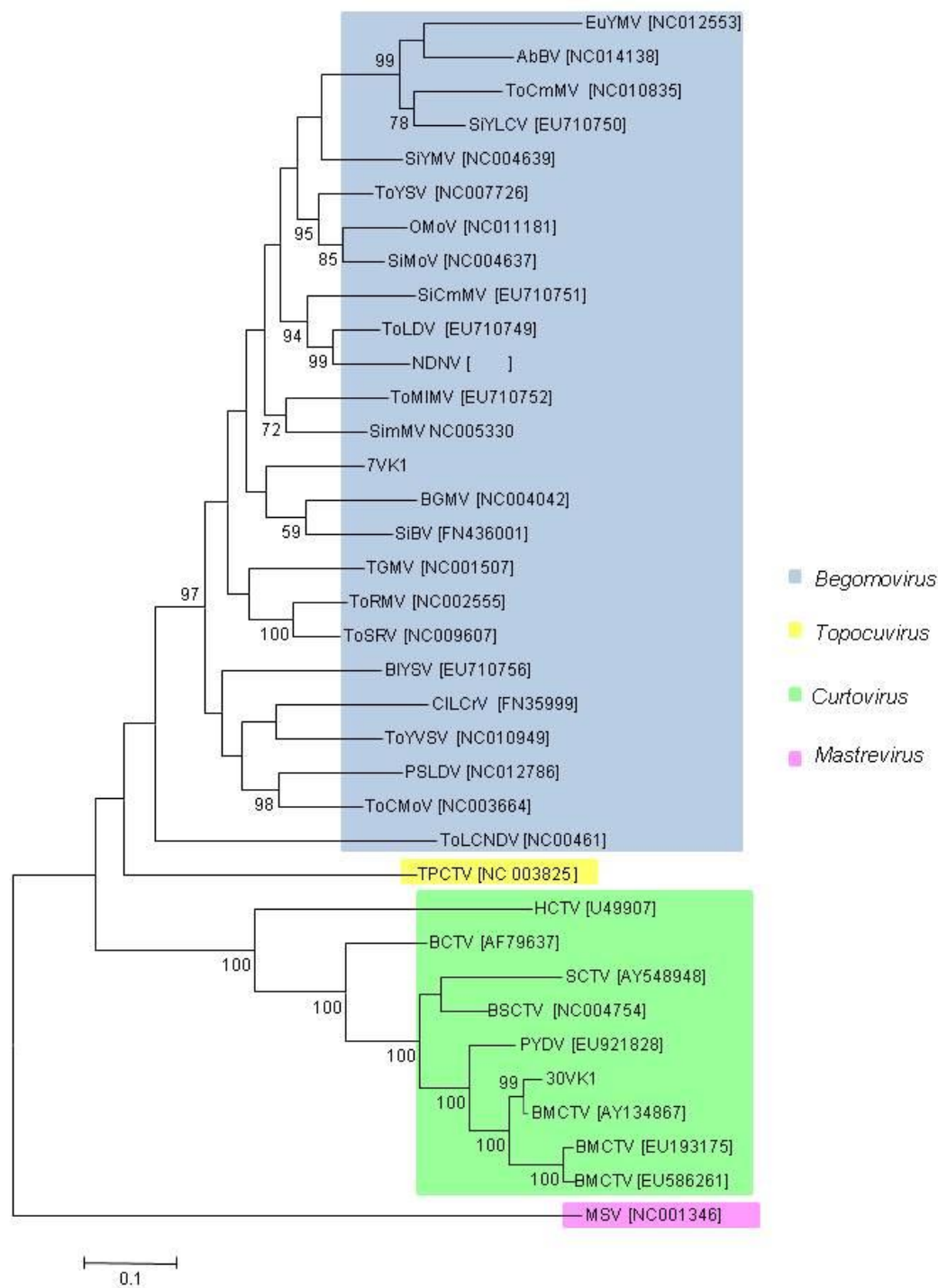
634

635



636

**Figura 5.** Árvore de máxima verossimilhança obtida a partir do alinhamento do DNA-A de seqüências de begomovírus das Américas, incluindo o isolado 7VK1. Números acima nos ramos indicam valores de bootstrap (1000 repetições) e abaixo as probabilidades posteriores obtidas através da análise de inferência Bayesiana.



637

638 **Figura 6.** Árvore de máxima verossimilhança obtida a partir do alinhamento das  
 639 seqüências dos isolados 7VK1 e 30VK1 com begomovírus do Brasil e espécies  
 640 representantes de todos os gêneros da Família *Geminiviridae*. Os números nos ramos  
 641 indicam valores de bootstrap (1000 repetições).

## CONCLUSÕES GERAIS

- Os resultados deste estudo mostraram que *Dioscorea alata bacilliform virus* (DaBV) é a espécie de vírus de maior prevalência da cultura do inhame no Nordeste brasileiro;
- Constataram-se evidências da presença de sequências endógenas integradas com homologia a *Badnavirus* na cultura do inhame;
- A técnica de RCA pode ser utilizada para detectar diversos vírus de genoma circular em plantas de inhame;
- A cultura do inhame comporta-se como um centro de dispersão e evolução de novos vírus como os da família Geminiviridae, detectados pela primeira vez nesta cultura;
- Estudos adicionais, incluindo testes biológicos e genealogia são necessários para elucidar questionamentos a respeito da origem e evolução dos vírus que infectam inhame no Nordeste brasileiro.