



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL
DE PERNAMBUCO**
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO



**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM FITOPATOLOGIA**

Dissertação de Mestrado

**Detecção de novas espécies virais em inhame (*Dioscorea*
spp.) no Brasil por sequenciamento de nova geração**

Evelyn Anly Ishikawa Hayashi

Recife – PE

2016

EVELYN ANLY ISHIKAWA HAYASHI

**DETECÇÃO DE NOVAS ESPÉCIES VIRAIS EM INHAME (*DIOSCOREA SPP.*) NO
BRASIL POR SEQUENCIAMENTO DE NOVA GERAÇÃO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Fitopatologia.

COMITÊ DE ORIENTAÇÃO:

Orientador: Prof. Dr. Gilvan Pio Ribeiro (UFRPE)

Co-Orientador: Prof. Dr. Tatsuya Nagata (UnB)

Co-Orientadora: Dra. Genira Pereira de Andrade (UFRPE)

**RECIFE-PE
FEVEREIRO-2016**

Ficha catalográfica

H413d Hayashi, Evelyn Anly Ishikawa
Detecção de novas espécies virais em inhame (*Dioscorea*
spp.) no Brasil por sequenciamento de nova geração / Evelyn
Anly Ishikawa Hayashi. – Recife, 2016.
59 f. : il.

Orientador: Gilvan Pio Ribeiro.
Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade
Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Agronomia,
Recife, 2016.
Referências.

1. PCR 2. NGS 3. *Secoviridae* 4. *Closteroviridae* 5. *Foveavirus*
I. Ribeiro, Gilvan Pio, orientador II. Título

CDD 632

**DETECÇÃO DE NOVAS ESPÉCIES VIRAIS EM INHAME (*DIOSCOREA SPP.*) NO
BRASIL POR SEQUENCIAMENTO DE NOVA GERAÇÃO**

EVELYN ANLY ISHIKAWA HAYASHI

Dissertação defendida e aprovada pela Banca Examinadora em: 29/ 02 /2016.

ORIENTADOR:

Prof. Dr. Gilvan Pio Ribeiro (UFRPE)

EXAMINADORES:

Profa. Dra. Elineide Barbosa de Sousa (UFRPE)

Dra. Genira Pereira de Andrade (UFRPE)

**RECIFE-PE
FEVEREIRO-2016**

*Aos meus pais Elna e Júlio, que me apoiaram
e acreditaram no meu potencial.*

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pela oportunidade de crescimento e aprimoramento profissional e pessoal. Por ter me dado a força e sabedoria necessária para enfrentar os desafios ao longo desses dois anos e por me fazer entender que na vida não acumulamos derrotas e sim oportunidades de aprender novas lições para nos tornar pessoas cada vez melhores;

À Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), em especial ao Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia (PPGF) pela oportunidade de realizar o Curso de Mestrado e aos professores pelos ensinamentos;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (Facepe), pelo apoio recebido;

À Universidade de Brasília (UnB), por oferecer o suporte e espaço necessários para a execução do trabalho;

Ao professor Dr. Gilvan Pio Ribeiro e à Dra. Genira Pereira de Andrade, pelo apoio, paciência, conselhos e ensinamentos transmitidos;

Ao professor Dr. Tatsuya Nagata, por ter me acolhido como parte da sua equipe. Pela paciência, confiança, conselhos, incentivo profissional e principalmente pelos conhecimentos adquiridos;

À minha família, por incentivar e apoiar minhas decisões, sejam elas quais forem. Por serem o meu porto seguro nos melhores e piores momentos.

Ao meu namorado Rubens Jr. pelo apoio e paciência incondicionais. Pelas noites mal dormidas ouvindo minhas lamentações e pelas incontáveis palavras de carinho e incentivo durante esses dois anos;

Aos membros do Laboratório de Microscopia Eletrônica da UnB, que quer seja de maneira direta ou indireta fizeram este trabalho possível e a minha estadia em Brasília mais agradável;

À professora Dra. Rosana Blawid, pelo companheirismo, apoio, paciência, conselhos, ensinamentos e principalmente pela amizade e carinho.

Às minhas amigas do PPGF (Daniele Barbosa, Carmem Abade, Gabriela Calderón, Gerusa Santos, Michele Santiago e Soraya Silva), pelos ótimos momentos, amizade e companheirismo que, sem dúvida, me ajudaram nesta caminhada.

SUMÁRIO	Página
AGRADECIMENTOS	iv
RESUMO GERAL	vi
GENERAL ABSTRACT	vii
CAPÍTULO I – Introdução Geral	1
Aspectos gerais da cultura do inhame e importância econômica	2
Vírus que infectam <i>Dioscorea</i> spp.	3
Família <i>Closteroviridae</i>	4
Família <i>Secoviridae</i>	6
Gênero <i>Foveavirus</i> (Família <i>Betaflexiviridae</i>)	8
Sequenciamento de Nova Geração na Virologia Vegetal	9
Referências Bibliográficas	12
CAPÍTULO II - Detection of a new virus belonging to <i>Closteroviridae</i> family in yam of Brazil	23
Abstract	23
Resumo	24
References	28
CAPÍTULO III - Complete genome sequence of a new secovirus infecting on <i>Dioscorea</i> plant	31
Abstract	33
Resumo	33
References	36
CAPÍTULO IV - Complete genome sequence of a new foveavirus infecting on <i>Dioscorea</i> plant	40
Abstract	42
Resumo	43
References	46
CONCLUSÕES GERAIS	50

RESUMO GERAL

O inhame (*Dioscorea* spp.) apresenta importante papel socioeconômico nas regiões tropicais e subtropicais da Ásia, África e Américas incluindo o Caribe. No Brasil, se constitui uma expressiva fonte de renda e alimento para as populações locais e agricultura familiar, principalmente na região Nordeste do país. A produtividade da cultura é bastante afetada, tanto por fatores abióticos, como por agentes bióticos, entre os quais fungos, nematoides e vírus. Doenças causadas por vírus são importantes, pois a propagação vegetativa do inhame proporciona o acúmulo e disseminação desses patógenos em cultivos sucessivos. Até o momento, os vírus relatados nesta cultura pertencem a nove gêneros: *Aureusvirus*, *Badnavirus*, *Carlavirus*, *Comovirus*, *Cucumovirus*, *Fabavirus*, *Macluravirus*, *Potexvirus* e *Potyvirus*. No presente trabalho objetivou-se analisar, através do Sequenciamento de Nova Geração (Next Generation Sequencing - NGS), as diferentes espécies virais que infetam o inhame em plantios localizados nos estados de Pernambuco e Paraíba e no Distrito Federal. Amostras de tecido foliar de *D. rotundata* e *D. alata* foram submetidas a purificação viral parcial, o RNA total foi extraído e submetido ao NGS. As leituras nucleotídicas obtidas foram montadas utilizando o programa CLC Genomics Workbench 6.5 e os *contigs* utilizando o programa Geneious. Por meio dos dados obtidos por NGS foi possível a detecção de três espécies virais novas relatadas neste trabalho. Foi sequenciado o genoma completo de duas espécies, uma pertencente à família *Secoviridae*, que recebeu o nome Dioscorea virus S (DVS), e outra ao gênero *Foveavirus* da família *Betaflexiviridae*, denominada de Dioscorea virus F (DVF). Para a terceira espécie descrita, pertencente à família *Closteroviridae*, foi feita apenas a detecção viral nas amostras coletadas e a proposição do nome Dioscorea virus C (DVC).

Palavras-chave: PCR, NGS, *Secoviridae*, *Closteroviridae*, *Foveavirus*

GENERAL ABSTRACT

The yam (*Dioscorea* spp.) has an important socio-economic role in tropical and subtropical regions of Asia, Africa and the Americas including the Caribbean. In Brazil, it is a significant source of income and food for the local populations and family agriculture, especially in the Northeast region of the country. The crop yield is very affected by both abiotic factors and biotic agents, including fungi, nematodes and viruses. Diseases caused by viruses are important because the vegetative propagation of yam provides the accumulation and spread of these pathogens on successive crops. To date, the reported viruses in this crop belong to nine genera: *Aureusvirus*, *Badnavirus*, *Carlavirus*, *Comovirus*, *Cucumovirus*, *Fabavirus*, *Macluravirus*, *Potexvirus* and *Potyvirus*. The objective of the present work was to analyze, through the Next Generation Sequencing (NGS), different viral species that infect the yam in fields located in the states of Pernambuco and Paraíba and in the Federal District. Leaf tissue samples of *D. rotundata* and *D. alata* were subjected to partial virus purification, the total RNA was extracted and submitted to NGS. The nucleotide reads obtained were assembled using CLC Genomics Workbench 6.5 program and the contigs using Geneious program. Based on the data obtained from NGS it was possible to detect three new virus species reported in this work. It was sequenced the complete genome of two new species, one belonging to the family *Secoviridae*, with the proposed name Dioscorea virus S (DVS), and another to *Foveavirus* genus of the family *Betaflexiviridae*, called Dioscorea virus F (DVF). For the third species described, belonging to the family *Closteroviridae*, it was done only the viral detection in the collected samples and proposed the name Dioscorea virus C (DVC).

Keywords: PCR, NGS, *Secoviridae*, *Closteroviridae*, *Foveavirus*

CAPÍTULO I



Introdução geral

DETECÇÃO DE NOVAS ESPÉCIES VIRAIS EM INHAME (*DIOSCOREA* SPP.) NO BRASIL POR SEQUENCIAMENTO DE NOVA GERAÇÃO

INTRODUÇÃO GERAL

Aspectos gerais da cultura do inhame e importância econômica

A planta de inhame é uma angiosperma monocotiledônea pertencente à família Dioscoreaceae, da qual o gênero *Dioscorea* é composto por cerca de 600 espécies diferentes distribuídas principalmente em áreas subtropicais ou tropicais da África, Ásia, Américas e Oceania (NGO-NGWE et al., 2014). Dentre as espécies de inhame, apenas dez fornecem produtos comestíveis: *Dioscorea alata* L., *D. rotundata* Poir., *D. cayenensis* Lam., *D. bulbifera* L., *D. esculenta* Burk., *D. opposita* Thunb., *D. japonica* Thunb., *D. nummularia* Lam., *D. pentaphylla* L. e *D. trifida* L. (SARTIE; ASIEDU; FRANCO, 2012).

Acredita-se que o gênero *Dioscorea* se dispersou pelo mundo no final do período Cretáceo. As principais regiões para onde houve a dispersão de muitas espécies foram as Américas, África, Madagascar, Sul e Sudeste Asiático e Oceania. As espécies *D. esculenta* e *D. alata* originaram-se no Sudeste Asiático, já *D. cayenensis* tem sua origem na África e *D. trifida* na América do Sul. As demais espécies cultivadas de inhame tiveram suas origens na África e Ásia (SIQUEIRA, 2011).

O inhame é a quarta cultura tuberosa mais importante do mundo em termos econômicos, estando atrás apenas da batata (*Solanum tuberosum* L.), mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) e batata-doce (*Ipomoea batatas* (L.) Poir.). A África Ocidental é a principal região produtora de inhame no mundo com aproximadamente 62 milhões de toneladas (91% da produção mundial) em 2014, correspondendo a uma área plantada de cerca sete milhões de hectares. Na América do Sul, a Colômbia é a maior produtora. O Brasil fica em segundo lugar produzindo 247 mil toneladas em uma área plantada de quase 26 mil hectares (FAO, 2014)

Devido ao elevado teor de amido, a túbera de inhame tem alto valor nutritivo, desempenhando papel fundamental na alimentação humana em continentes como a Ásia, África e Américas, incluindo o Caribe (MAMBOLE et al., 2014; SEAL et al., 2014). A cultura do inhame possui grande importância para a economia local de vários países subdesenvolvidos, tanto pela geração de empregos quanto pela comercialização de seu produto seja *in natura* para o consumo local ou na forma de produtos medicinais como fonte de antioxidantes e também na indústria farmacêutica na extração de metabólitos secundários (GHOSH et al., 2013; NYABOGA et al., 2014).

No Brasil, o inhame tem elevado valor socioeconômico na região Nordeste, uma vez que a túbera está intimamente ligada aos hábitos alimentares da população tendo a produção, principalmente, advinda da agricultura familiar voltada para o consumo interno (OLIVEIRA; FREITAS NETO; SANTOS, 2001). O estado de Pernambuco se destaca como maior produtor e grande consumidor de inhame, fator positivo para agricultura familiar e conseqüentemente o desenvolvimento rural, uma vez que, além dos empregos diretos, a cadeia produtiva da cultura também é geradora de empregos indiretos envolvidos no armazenamento, transporte e comercialização da túbera (OLIVEIRA et al., 2012).

Apesar de sua importância socioeconômica para muitas regiões do mundo, a cultura do inhame ainda encontra várias limitações em relação a sua produtividade. Isto se deve principalmente à falta de investimentos em tecnologias e pesquisas com abordagens bioquímicas e moleculares, como também ao manejo inadequado da cultura, com a utilização de técnicas agrônômicas defasadas (SASKI et al., 2015).

O cultivo do inhame é afetado significativamente pela elevada incidência e severidade de doenças bióticas e abióticas, com destaque para as causadas por fungos e nematoides, para as quais se medidas preventivas não sejam aplicadas, representam um importante fator limitante para a produção (OLIVEIRA; MOURA; MAIA 2005). As viroses, a Queima ou Pinta-preta (*Curvularia eragostides*), Podrião-verde (*Penicillium sclerotigenum*) e as nematoses Casca-preta (*Pratylenchus coffea* e *Scutellonema bradys*) e Meloidoginose (*Meloidogyne* spp.) são as principais doenças que afetam a cultura, causando em grandes perdas, tanto no campo quanto no transporte e armazenamento (ANDRADE, 2007; SANTOS et al., 2009; SIQUEIRA, 2011).

Vírus que infectam *Dioscorea* spp.

As viroses são de particular importância para a cultura do inhame, pois a floração e emissão de sementes são raras, sendo utilizada comercialmente a propagação vegetativa por meio de pequenas túberas ou pedaços das mesmas, favorecendo o acúmulo e perpetuação dos vírus em plantios sucessivos (SEAL; MULLER, 2007; SILVA et al., 2015).

As espécies virais que infectam *Dioscorea* spp., relatadas até o momento, pertencem a nove gêneros: *Aureusvirus* – *Yam spherical virus* (YSV); *Badnavirus* - *Dioscorea bacilliform viruses* (DBV) e *Dioscorea bacilliform alata virus* (DBALV); *Carlavirus* – *Hop latent virus* (HpLV); *Comovirus* – *Dioscorea mottle virus* (DmoV); *Cucumovirus* – *Cucumber mosaic virus* (CMV); *Fabavirus* – *Broad bean wilt virus 2* (BBWV-2); *Macluravirus* – *Chinese yam*

necrotic mosaic virus (CYNMV); *Potexvirus – Yam virus X* (YVX); *Potyvirus – Yam mosaic virus* (YMV) e *Yam mild mosaic virus* (YMMV). No entanto, a diversidade de vírus que infectam a planta de inhame permanece largamente inexplorado. O impacto das infecções virais no rendimento e qualidade das túberas pode ser uma importante ameaça para a sustentabilidade desta cultura. Por exemplo, o cultivo de *D. trifida* está passando por um forte declínio no Caribe devido a sua alta susceptibilidade às potyvirose (MAMBOLE et al., 2014; SEAL et al., 2014).

Estudos apontam que os badnavírus causam as viroses do inhame que mais prevalessem no mundo (SEAL et al., 2014). Entretanto, os potyvírus que ocorrem nesta cultura são mais estudados (ENI et al., 2010), a exemplo do YMV, tido como a espécie viral de maior importância econômica, podendo causar uma variedade de sintomas, incluindo mosaico, clorose, deformação foliar e nanismo (SILVA et al., 2015).

No Brasil, duas espécies importantes do gênero *Potyvirus* foram relatadas, o YMV e o YMMV (FILHO et al., 2013). O YMV ocorre comumente em plantas pertencentes ao complexo *D. cayennensis-D. rotundata* e com menor incidência e importância em *D. alata*.

As plantas de *D. alata* estudadas em diferentes áreas da Nigéria apresentaram infecção viral (ODU et al., 2006). Dentre os badnavírus, o DBALV é o mais difundido no mundo, sendo detectado também no Brasil em quase todas as áreas produtoras de inhame causando infecção simples ou mista podendo induzir distorção foliar e clorose (UMBER et al., 2014).

Infecções mistas de vírus têm sido relatadas na cultura de inhame como, por exemplo, a ocorrência de YMV e YMMV (MOHAMED, N.A.; MANTELL, S.H, 1976). Em condições de campo, este tipo de interação dificulta a identificação das espécies virais causadoras das doenças, além de aumentar a intensidade de sintomas resultante da ação sinérgica entre vírus, com maior reflexo na produtividade.

Família *Closteroviridae*

Membros pertencentes a família *Closteroviridae* possuem os maiores e mais complexos genomas de fita simples de RNA, podendo variar de tamanho de 15-20 kb (FAYEZ; MAHMOUD, 2011). Os closterovírus (nome genérico para os vírus da família) são oficialmente divididos em três gêneros (*Closterovirus*, *Crinivirus* e *Ampelovirus*) e a inclusão de um quarto gênero (*Velarivirus*) foi proposto recentemente (KISS; MEDINA; FALK, 2013; ITO; SATO; SUZAKI, 2015). Membros da família possuem partículas virais flexuosas

filamentosas com 700-2.000 nm de comprimento e 12 nm de diâmetro, podendo o genoma ser mono ou multipartido (FAYEZ; MAHMOUD, 2011).

Os vírus do gênero *Closterovirus* possuem genoma monopartido com tamanho variado entre 15,5 a 19,3 Kb e são transmitidos por diversos afídeos. O gênero *Crinivirus* engloba os vírus com genoma bipartido ou tripartidos e são transmitidos exclusivamente por moscas-branca pertencentes aos gêneros *Bemisia* e *Trialeurodes*. Espécies do gênero *Ampelovirus* possuem genoma monopartido com 16.9 – 19.9 Kb de tamanho, sendo transmitidos por cochonilhas. O gênero *Velarivirus* é formado por espécies anteriormente incluídos no gênero *Ampelovirus* que representam um clado diferente na árvore filogenética (ISOGAI et al., 2013; KISS; MEDINA; FALK, 2013). Embora o número e a posição relativa das fases abertas de leitura, ou em inglês “Open Read Frames” (ORFs), possam mudar de espécies para espécie, a organização genômica é a mesma. Todos os closterovírus possuem dois genes conservados, incluindo um que codifica proteínas associadas com a replicação (ORFs 1a e 1b) e um quádruplo “gene block” que codificam proteínas que constituem a partícula viral ou que estão envolvidas no movimento célula-a-célula ou outros processos biológicos (Fig. 1) (KISS; MEDINA; FALK, 2013; RUBIO; GUERRI; MORENO, 2013).

A família *Closteroviridae* inclui espécies virais de grande importância agrônômica. Uma das mais conhecidas é o *Citrus triteza virus* (CTV), pertencente ao gênero *Closterovirus*, responsável por epidemias devastadoras que dizimaram plantações inteiras de citros e mudou o curso das indústrias cítricas do mundo. Dependendo da combinação porta-enxerto-estirpe viral-enxerto, o CTV induz três síndromes distintas: rápido declínio seguido de morte da planta, canelura e mudas amareladas. Medidas de controle para o CTV incluem: programa de quarentena, eliminação de plantas infectadas, uso de porta-enxertos tolerantes ou proteção cruzada com isolados menos agressivos (MORENO et al., 2008; BAR-JOSEPH; MAWASSI, 2013; OWEN et al., 2014). Na videira, diferentes espécies pertencentes à família *Closteroviridae* causam a doença viral de maior importância econômica que afeta a cultura, denominada de “Grapevine leafroll disease” (LUNDEN; QIU, 2011; AL RWAHNIH et al., 2012).

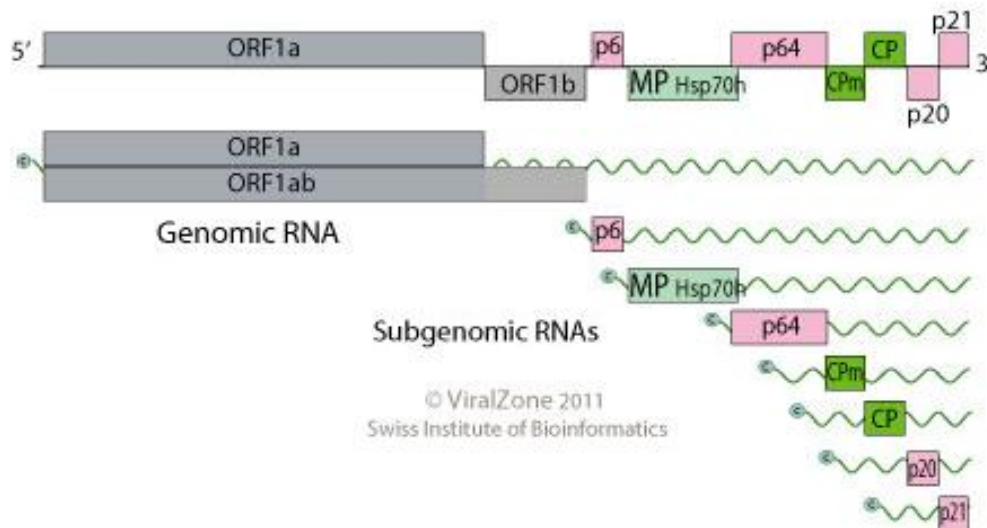


Figura 1. Representação da organização genômica típica dos membros da família *Closteroviridae*. As ORFs 1a e 1b codificam proteínas relacionadas à replicação viral. O quintuplo ‘gene block’ (p6, MP, p64, p20 e p21) que codificam proteínas envolvidas no movimento célula-a-célula do vírus e na interação da partícula viral com o hospedeiro. CP e CPm codificam proteínas capsidiais. ExPASy (www.viralzone.expasy.org)

Família *Secoviridae*

A família *Secoviridae* é formada por vírus que infectam plantas pertencentes à Ordem *Picornavirales* (LE GALL et al., 2008). Criada desde 2008, a família *Secoviridae* é dividida em uma subfamília (*Comovirinae*) contendo três gêneros (*Nepovirus*, *Comovirus* e *Fabavirus*) e cinco gêneros (*Cheravirus*, *Sequivirus*, *Sadwavirus*, *Torradovirus*, *Waikavirus*) não atribuídos a nenhuma subfamília, além de espécies não atribuídas a nenhum gênero (SANFAÇON et al., 2009; KING; ADAMS; CARSTENS; LEFKOWITZ, 2012). Possuem partículas não-envelopadas, icosaédricas, com genoma composto por RNA de fita simples de senso positivo (+) monopartido ou bipartido, com uma VPg (proteína codificada pelo vírus) ligado na extremidade 5’ e poliadenilado na extremidade 3’ (THOMPSON; KAMATH; PERRY, 2014). Em membros da família com genoma composto por duas moléculas de RNA, o RNA1 codifica uma poliproteína que é clivada em cinco proteínas necessárias para a replicação viral. O RNA2 codifica uma poliproteína que é clivada em uma proteína de movimento e uma ou mais proteínas capsidiais (Figura 2) (YOO et al., 2015).

Virose de plantas causadas por membros da Ordem *Picornavirales*, geralmente, induzem efeitos citopatológicos similares em seus hospedeiros. Em células de plantas infectadas com vírus dos gêneros *Nepovirus*, *Comovirus*, *Fabavirus*, *Cheravirus*, *Sequivirus* e

Sadwavirus foram observadas estruturas tubulares que atravessam a parede celular possibilitando o movimento célula-a-célula do vírus (SANFAÇON et al., 2009). A transmissão viral pode ocorrer por meio de vetores (mosca-branca, nematoide, ácaro, etc.), pólen ou sementes (SDOODEE; TEAKLE, 1987; SUSI, 2004; LE GALL et al., 2007)

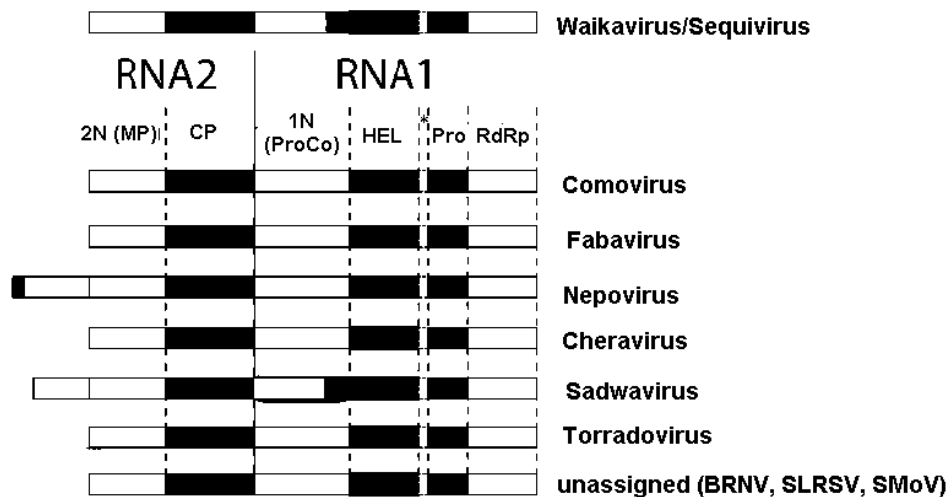


Figura 2. Esquema simplificado da organização genômica dos gêneros pertencentes a família *Secoviridae*. Ao lado de cada organização genômica está o nome do respectivo gênero. Alinhamento das regiões codificantes dos vírus monopartidos (*Waikavirus* e *Sequivirus*) com os bipartidos (*Comovirus*, *Fabavirus*, *Nepovirus*, *Cheravirus*, *Sadwavirus*, *Torradovirus* e espécies não classificadas (*Black raspberry necrosis virus* - BRNV, *Strawberry latent spherical virus* - SLRSV e *Strawberry mottle virus* - SMoV) (THOMPSON; KAMATH; PERRY, 2014).

Agronomicamente, o *Grapevine fanleaf virus* (GFLV), pertencente à família *Secoviridae* tem impacto significativo na videira, causando a virose mais difundida da cultura. O *Rice tungro spherical virus* (RTSV), juntamente com outra espécie viral, causa uma importante doença que interrompeu a produção de arroz na Ásia na década de 1960 (THOMPSON; KAMATH; PERRY, 2014). Nas últimas décadas houve um aumento no número de espécies conhecidas pertencentes à família *Secoviridae*, dentre elas: *Apple latent spherical virus* (ALSV) (LI et al., 2000), *Cherry rasp leaf virus* (CRLV) (THOMPSON; PERRY; DE JONG, 2004), *Satsuma dwarf virus* (SDV) (IWANAMI; KONDO; KARASEV, 1999), *Strawberry mottle virus* (SMoV) (LINDNER et al., 2002), *Strawberry latent ringspot virus* (SLRSV) (TZANETAKIS et al., 2006) e *Tomato torrado virus* (ToTV) (VERBEEK et al., 2007).

Como critérios para demarcação em nível de gênero da família *Secoviridae* são utilizados a quantidade de RNAs genômicos, número de domínios proteicos e/ou sítios de clivagem da poliproteína, número de proteínas capsidiais e presença de ORFs adicionais e/ou RNAs subgenômicos. Dentre os critérios para demarcação de espécies citam-se: identidade de sequência de aminoácidos de pelo menos 75% da capa proteica e de 80% da região conservada da poliproteína delimitada pelo *motif* “CG” da protease e o *motif* “GDD” da polimerase (KING; ADAMS; CARSTENS; LEFKOWITZ, 2012).

Em um estudo realizado por Filloux et al. (2015) foi detectado sequências virais com significativa similaridade a espécies pertencentes a família *Secoviridae* em plantas de inhame utilizando o sequenciamento de alto desempenho. Dentre as sequências encontradas, três possuem similaridade com vírus do gênero *Sadwavirus* e três não puderam ser classificadas em nenhum gênero da família.

Gênero *Foveavirus* (Família *Betaflexiviridae*)

O gênero *Foveavirus* pertence à família *Betaflexiviridae*, Ordem *Tymovirales* e diferem dos outros membros da família por possuírem cinco ORFs e CPs maiores do que a maioria das outras espécies (Fig. 3). Os vírions são flexuosos filamentosos com cerca de 800–1.000 nm de comprimento e de 12–15 nm de diâmetro com simetria helicoidal. Possuem genoma de fita simples de RNA senso positivo (+) com tamanho de 8,4–9,3 Kb poliadenilado na extremidade 3' (KING; ADAMS; CARSTENS; LEFKOWITZ, 2012).

As espécies desse gênero se destacam por ocorrerem naturalmente plantas lenhosas, como videira e fruteiras de clima temperado das famílias Maloideae e Prunoideae (YOUSSEF et al., 2011), apresentando maiores dificuldades para serem estudados. Infectam plantas que necessitam de um período longo no processo de propagação, difíceis de serem inoculadas, quer seja por enxertia ou através de insetos vetores, além das partículas virais serem normalmente mal distribuídas na planta e em baixas concentrações e difíceis de serem purificadas, por causa da presença de substâncias inibidoras, tais como polifenóis e polissacarídeos (MENG et al., 2013; MARAIS; FAURE; CANDRESSE, 2016).

A espécie tipo do gênero *Foveavirus* é o *Apple stem pitting virus* (ASPV), amplamente difundido em cultivares de macieira comerciais (MARTELLI; JELKMANN, 1998). Os demais membros do gênero têm sido caracterizados em espécies de *Prunus* na última década, incluindo *Apricot latent virus* (APLV), Asian prunus virus 1 (APV1) e *Peach chlorotic mottle virus* (PCMoV) (YOUSSEF et al., 2011).

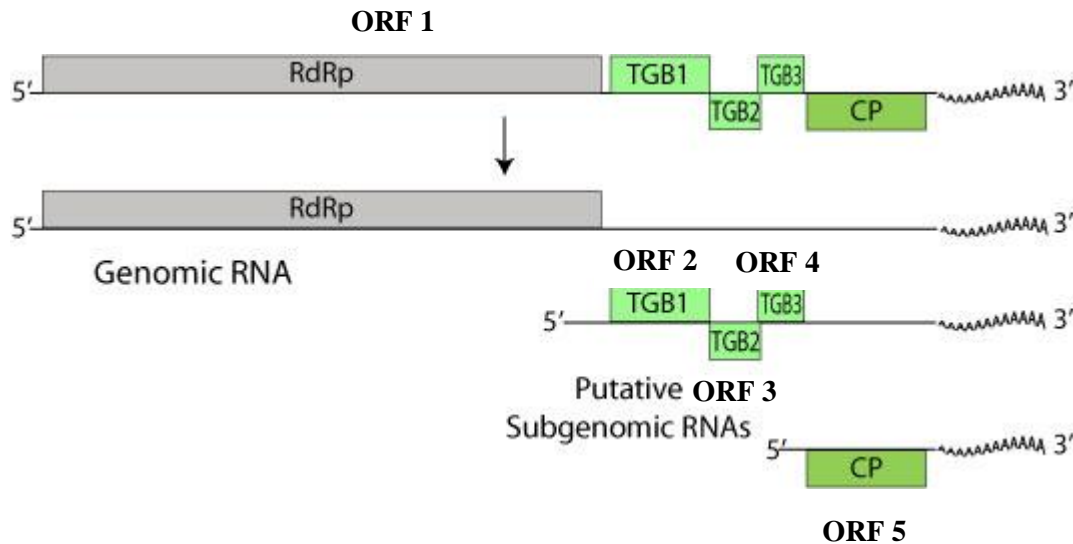


Figura 3. Representação da organização genômica dos foveavírus. ORF 1 codifica proteínas relacionadas a replicação viral. ORFs 2 – 4 codificam proteínas envolvidas no movimento célula-à-célula. ORF 5 codifica a proteína capsial. Adaptado de ExpASy (www.viralzone.expasy.org)

Sequenciamento de Nova Geração na Virologia Vegetal

Para se estabelecer medidas eficientes de manejo de doenças e avaliação de matrizes para produção de túberas-semente de inhame ou material de propagação de qualquer outra cultura, a correta identificação dos agentes causais é o primeiro passo. No caso de viroses, a diagnose pode ser muitas vezes complexa, especialmente quando um determinado vírus esteja ocorrendo em um novo hospedeiro ou quando se trate de uma nova espécie viral ou variante de um vírus conhecido (PRABHA; BARANWAL; JAIN, 2013).

Devido ao seu pequeno tamanho e a incapacidade de serem cultivados em meio de cultura, os vírus apresentam uma dificuldade maior na sua identificação e detecção comparado a outros patógenos. Nas últimas décadas, a diagnose de viroses tem sido realizada utilizando técnicas sorológicas como *Enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) e os métodos moleculares *Polymerase Chain Reaction* (PCR) e hibridização de ácido nucleico. Entretanto, por necessitarem de reagentes como anticorpos, *primers* e sondas, desenvolvidas a

partir do vírus caracterizados, tais técnicas se tornam ineficientes quando a doença é causada por uma espécie viral desconhecida (WU et al., 2015).

Nos últimos anos, novas abordagens para detecção e identificação de vírus têm sido desenvolvidas. Dentre as mais utilizadas atualmente, a metagenômica é uma das principais, capaz de analisar o ácido nucleico total contido em uma amostra ou num conjunto de amostras, através do Sequenciamento de Nova Geração, permitindo identificar tanto de patógenos conhecidos quanto de patógenos desconhecidos (SCHLOSS; HANDELSMAN, 2003; RIESENFELD; SCHLOSS; HANDELSMAN, 2004; WU et al., 2015). Trata-se de sequenciamento de alto desempenho e, por isto, recebeu a denominação em inglês é *Next-Generation Sequencing* (NGS).

A técnica Sanger é um método de sequenciamento utilizado como padrão para a identificação e caracterização viral, descrita primeiramente em 1977 (SANGER; NICKLEN; COULSON, 1977), enquanto que o NGS começou a ser comercializado em meados de 2004 como forma alternativa de sequenciamento convencional. O método Sanger pode processar centenas de nucleotídeos diários, ao passo que o novo método processa milhões de nucleotídeos no mesmo período (KIRCHER; KELSO, 2010).

O primeiro sequenciador de alto desempenho foi desenvolvido pela 454 Life Science em 2004 denominado de Roche/454 FLX (<http://www.454.com/>) (MARDIS, 2008). Já o analisador de genoma da Illumina (<http://www.illumina.com>) foi lançado no início de 2007 desenvolvido pela Solexa GA. Atualmente, diversas plataformas de sequenciamento mais avançadas estão disponíveis no mercado como, por exemplo, Heliscope desenvolvida pela Helicos (<http://www.helicosbio.com/>), Ion Torrent PGM da Life Technologies (<http://www.iontorrent.com/>) e a plataforma de sequenciamento em tempo-real da Pacific Biosciences (<http://www.pacificbiosciences.com/>) (PRABHA; BARANWAL; JAIN, 2013).

O NGS foi empregado pela primeira vez na Virologia Vegetal em 2009 e desde então vem sendo utilizado com sucesso nas áreas de sequenciamento de genoma, ecologia, descoberta de novas espécies, interação vírus-hospedeiro, epidemiologia, transcriptoma, detecção e identificação viral (ADAMS et al., 2009, 2013; MOKILI; ROHWER; DUTILH, 2012). Pelo menos 49 novos vírus de DNA e RNA de plantas já foram descobertos com o uso do NGS. Dentre essas novas espécies, 36 podem ser classificadas dentro de gêneros já existentes, nove possivelmente integraram novos gêneros e quatro não podem ser atribuídas a nenhuma família existente (HALGREN; TZANETAKIS; MARTIN, 2007).

Outro método empregado na identificação de espécies virais utilizando NGS é a remontagem de sequências virais a partir da sobreposição de *small interfering RNAs*

(siRNAs), uma vez que os mesmos são derivados do genoma viral, encontrados em plantas infectadas (PRABHA; BARANWAL; JAIN, 2013; SEGUIN et al., 2014). A pesquisa e sequenciamento de siRNAs têm papel fundamental no estudo da expressão gênica de vírus endógenos encontrados em planta, principalmente em relação ao estudo da interação planta-patógeno (FESCHOTTE; GILBERT, 2012; AIEWSAKUN; KATZOURAKIS, 2015). A incorporação de certas partes do genoma viral em plantas transgênicas podem gerar níveis diferentes de resistência ao vírus de origem e a isolados semelhantes (ANTIGNUS et al., 2004; SHEPHERD; MARTIN; THOMSON, 2009; LEIBMAN et al., 2015).

O mais recente relatório do Comitê Internacional para a Taxonomia de Vírus lista cerca de 900 vírus de plantas (KING; ADAMS; CARSTENS; LEFKOWITZ, 2012). Entretanto, com a utilização do NGS em Virologia Vegetal irá certamente aumentar este número significativamente à medida que novos vírus forem descobertos e caracterizados em diferentes espécies de plantas hospedeiras, incluindo as plantas silvestres e também em diferentes insetos vetores (WYLIE et al., 2012).

Diante da carência de pesquisas em relação à população viral do inhame, o presente trabalho teve como objetivo analisar o viroma da cultura através do NGS, focando na detecção e caracterização de espécies desconhecidas.

Referências Bibliográficas

- ADAMS, I. P.; GLOVER, R. H.; MONGER, W. A.; MUMFORD, R.; JACKEVICIENE, E.; NAVALINSKIENE, M.; SAMUITIENE, M.; BOONHAM, N. Next-Generation Sequencing and Metagenomic Analysis: A Universal Diagnostic Tool in Plant Virology. **Molecular Plant Pathology**, Oxford, v. 10, n. 4, p. 537–545, 2009.
- ADAMS, I. P.; MIANO, D. W.; KINYUA, Z. M.; WANGAI, A.; KIMANI, E.; PHIRI, N.; REEDER, R.; HARJU, V.; GLOVER, R.; HANY, U.; SOUZA-RICHARDS, R.; DEB NATH, P.; NIXON, T.; FOX, A.; BARNES, A.; SMITH, J.; SKELTON, A.; THWAITES, R.; MUMFORD, R.; BOONHAM, N. Use of next-Generation Sequencing for the Identification and Characterization of Maize Chlorotic Mottle Virus and Sugarcane Mosaic Virus Causing Maize Lethal Necrosis in Kenya. **Plant Pathology**, Oxford, v. 62, n. 4, p. 741–749, 2013.
- AIEWSAKUN, P.; KATZOURAKIS, A. Endogenous Viruses: Connecting Recent and Ancient Viral Evolution. **Virology**, New York, v. 479-480, p. 26–37, 2015.
- AL RWAHNIH, M.; DOLJA, V. V.; DAUBERT, S.; KOONIN, E. V.; ROWHANI, A. Genomic and Biological Analysis of Grapevine Leafroll-Associated Virus 7 Reveals a Possible New Genus within the Family Closteroviridae. **Virus Research**, Amsterdam, v. 163, n. 1, p. 302–309, 2012.
- ANDRADE, G. P. **Diagnóstico Fitossanitário da cultura do inhame (*Dioscorea spp.*) em áreas produtoras do Nordeste do Brasil**. 2007. 72 f. Tese (Tese em Fitopatologia) Universidade Federal de Pernambuco, Recife.
- ANTIGNUS, Y.; VUNSH, R.; LACHMAN, O.; PEARLSMAN, M.; MASLENIN, L.; HANANYA, U.; ROSNER, A. Truncated Rep Gene Originated from Tomato Yellow Leaf Curl Virus-Israel [Mild] Confers Strain-Specific Resistance in Transgenic Tomato. **Annals of Applied Biology**, London, v. 144, n. 1, p. 39–44, 2004.
- BAR-JOSEPH, M.; MAWASSI, M. The Defective RNAs of Closteroviridae. **Frontiers in Microbiology**, Lausanne, v. 4, p. 132, 2013.

ENI, A. o.; HUGHES, J. d'A.; ASIEDU, R.; REY, M. e. c. Survey of the Incidence and Distribution of Viruses Infecting Yam (*Dioscorea* Spp.) in Ghana and Togo. **Annals of Applied Biology**, London, v. 156, n. 2, p. 243–251, 2010.

FOOD AGRICULTURE ORGANIZATION. FAOSTAT. **Database Results 2014**.

Disponível em: <<http://faostat3.fao.org/download/Q/QC/E>>. Acesso em: 3 jan. 2016.

FAYEZ, K. A.; MAHMOUD, S. Y. Detection and Partial Characterization of a Putative Closterovirus Affecting *Ficus Carica*: Molecular, Ultrastructural and Physiological Aspects of Infected Leaves. **Acta Physiologiae Plantarum**, Warszawa, v. 33, n. 6, p. 2187–2198, 2011.

FESCHOTTE, C.; GILBERT, C. Endogenous viruses: insights into viral evolution and impact on host biology. **Nature Reviews Genetics**, London, v. 13, n. 4, p. 283–296, 2012.

FILHO, F. de A. C. R.; NICOLINI, C.; RESENDE, R. de O.; ANDRADE, G. P. de; PIO-RIBEIRO, G.; NAGATA, T. The Complete Genome Sequence of a Brazilian Isolate of Yam Mild Mosaic Virus. **Archives of Virology**, New York, v. 158, n. 2, p. 515–518, 2013.

FILLOUX, D.; MURRELL, S.; KOOHAPITAGTAM, M.; GOLDEN, M.; JULIAN, C.; GALZI, S.; UZEST, M.; RODIER-GOUD, M.; D'HONT, A.; VERNEREY, M. S.; WILKIN, P.; PETERSCHMITT, M.; WINTER S.; MURRELL, B.; MARTIN, D. P.; ROUMAGNAC, P. The genomes of many yam species contain transcriptionally active endogenous geminiviral sequences that may be functionally expressed. **Virus Evolution**, Oxford, v. 1, n. 1, p. 1-17, 2015.

GHOSH, S.; DERLE, A.; AHIRE, M.; MORE, P.; JAGTAP, S.; PHADATARE, S. D.; PATIL, A. B.; JABGUNDE, A. M.; SHARMA, G. K.; SHINDE, V. S.; PARDESI, K.; DHAVALA, D. D.; CHOPADE, B. A. Phytochemical Analysis and Free Radical Scavenging Activity of Medicinal Plants *Gnidia glauca* and *Dioscorea bulbifera*. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 8, n. 12, p. e82529, 2013.

HALGREN, A.; TZANETAKIS, I. E.; MARTIN, R. R. Identification, Characterization, and Detection of Black raspberry necrosis virus. **Phytopathology**, St. Paul, v. 97, n. 1, p. 44–50, 2007.

ICTV Virus Taxonomy 2014. Disponível em:

<<http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp>>. Acesso em: 5 jan. 2016.

ISOGAI, M.; MURAMATU, S.; WATANABE, M.; YOSHIKAWA, N. Complete Nucleotide Sequence and Latency of a Novel Blueberry-Infecting Closterovirus. **Journal of General Plant Pathology**, Oxford, v. 79, n. 2, p. 123–127, 2013.

ITO, T.; SATO, A.; SUZAKI, K. An Assemblage of Divergent Variants of a Novel Putative Closterovirus from American Persimmon. **Virus Genes**, Boston, v. 51, n. 1, p. 105–111, 2015.

IWANAMI, T.; KONDO, Y.; KARASEV, A. V. Nucleotide Sequences and Taxonomy of Satsuma Dwarf Virus. **The Journal of General Virology**, London, v. 80 (Pt 3), p. 793–797, 1999.

KING, A. M. Q.; ADAMS, M.J.; CARSTENS, E. B.;LEFCOWITS, E. J. **Virus taxonomy. Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses**. London: Elsevier Academic Press, 2012. 1327 p.

KIRCHER, M.; KELSO, J. High-Throughput DNA Sequencing--Concepts and Limitations. **BioEssays: News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology**, Cambridge, v. 32, n. 6, p. 524–536, 2010.

KISS, Z. A.; MEDINA, V.; FALK, B. W. Crinivirus replication and host interactions. **Frontiers in Microbiology**, Lausanne, v. 4, n. 99, p. 1-11, 2013.

LE GALL, O.; CHRISTIAN, P.; FAUQUET, C. M.; KING, A. M. Q.; KNOWLES, N. J.; NAKASHIMA, N.; STANWAY, G.; GORBALENYA, A. E. Picornavirales, a Proposed Order of Positive-Sense Single-Stranded RNA Viruses with a Pseudo-T = 3 Virion Architecture. **Archives of Virology**, New York, v. 153, n. 4, p. 715–727, 2008.

LE GALL, O.; SANFAÇON, H.; IKEGAMI, M.; IWANAMI, T.; JONES, T.; KARASEV, A.; LEHTO, K.; WELLINK, J.; WETZEL, T.; YOSHIKAWA, N. Cheravirus and Sadwavirus: Two Unassigned Genera of Plant Positive-Sense Single-Stranded RNA Viruses Formerly Considered Atypical Members of the Genus Nepovirus (family Comoviridae). **Archives of Virology**, New York, v. 152, n. 9, p. 1767–1774, 2007.

LEIBMAN, D.; PRAKASH, S.; WOLF, D.; ZELCER, A.; ANFOKA, G.; HAVIV, S.; BRUMIN, M.; GABA, V.; ARAZI, T.; LAPIDOT, M.; GAL-ON, A. Immunity to Tomato

Yellow Leaf Curl Virus in Transgenic Tomato Is Associated with Accumulation of Transgene Small RNA. **Archives of Virology**, New York, v. 160, n. 11, p. 2727–2739, 2015.

LI, C.; YOSHIKAWA, N.; TAKAHASHI, T.; ITO, T.; YOSHIDA, K.; KOGANEZAWA, H. Nucleotide Sequence and Genome Organization of Apple Latent Spherical Virus: A New Virus Classified into the Family Comoviridae. **The Journal of General Virology**, London, v. 81, n. 2, p. 541–547, 2000.

LINDNER, J. L.; SCHOEN, C. D.; JELKMANN, W.; THOMPSON, J. R.; LEONE, G. Characterization and Complete Nucleotide Sequence of Strawberry Mottle Virus: A Tentative Member of a New Family of Bipartite Plant Picorna-like Viruses. **Journal of General Virology**, London, v. 83, n. 1, p. 229–239, 2002.

LUNDEN, S.; QIU, W. First Report of Grapevine leafroll-associated virus 2 in a Hybrid Grape “Vidal Blanc” in Missouri. **Plant Disease**, St. Paul, v. 96, n. 3, p. 462–462, 2011.

MAMBOLE, I. A.; BONHEUR, L.; DUMAS, L. S.; FILLOUX, D.; GOMEZ, R.-M.; FAURE, C.; LANGE, D.; ANZALA, F.; PAVIS, C.; MARAIS, A.; ROUMAGNAC, P.; CANDRESSE, T.; TEYCHENEY, P.Y. Molecular Characterization of Yam Virus X, a New Potexvirus Infecting Yams (*Dioscorea* Spp) and Evidence for the Existence of at Least Three Distinct Potexviruses Infecting Yams. **Archives of Virology**, New York, v. 159, n. 12, p. 3421–3426, 2014.

MARAIS, A.; FAURE, C.; CANDRESSE, T. New Insights into Asian Prunus Viruses in the Light of NGS-Based Full Genome Sequencing. **PloS One**, San Francisco, v. 11, n. 1, p. e0146420, 2016.

MARDIS, E. R. Next-Generation DNA Sequencing Methods. **Annual Review of Genomics and Human Genetics**, Palo Alto, v. 9, p. 387–402, 2008.

MARTELLI, G. P.; JELKMANN, W. Foveavirus, a New Plant Virus Genus. **Archives of Virology**, New York, v. 143, n. 6, p. 1245–1249, 1998.

MENG, B.; VENKATARAMAN, S.; LI, C.; WANG, W.; DAYAN-GLICK, C.; MAWASSI, M. Construction and Biological Activities of the First Infectious cDNA Clones of the Genus Foveavirus. **Virology**, New York, v. 435, n. 2, p. 453–462, 2013.

MOKILI, J. L.; ROHWER, F.; DUTILH, B. E. Metagenomics and Future Perspectives in Virus Discovery. **Current Opinion in Virology**, Amsterdam, v. 2, n. 1, p. 63–77, 2012.

MORENO, P.; AMBRÓS, S.; ALBIACH-MARTÍ, M. R.; GUERRI, J.; PEÑA, L. Citrus Tristeza Virus: A Pathogen That Changed the Course of the Citrus Industry. **Molecular Plant Pathology**, Oxford, v. 9, n. 2, p. 251–268, 2008.

MOHAMED, N.A.; MANTELL, S.H. Incidence of Virus Symptoms in Yam (*Dioscorea Sp.*) Foliage in the Commonwealth Caribbean. **Tropical Agriculture**, 1976. Disponível em: <<http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=GB19770149677>>. Acesso em: 9 jan. 2016.

NGO-NGWE, M. F. S.; JOLY, S.; BOURGE, M.; BROWN, S.; OMOKOLO, D. N. Nuclear DNA Content Analysis of Four Cultivated Species of Yams (*Dioscorea Spp.*) from Cameroon. **Journal of Plant Breeding and Genetics**, Lahore, v. 2, n. 2, p. 87–95, 2014.

NYABOGA, E.; TRIPATHI, J. N.; MANOHARAN, R.; TRIPATHI, L. Agrobacterium-Mediated Genetic Transformation of Yam (*Dioscorea Rotundata*): An Important Tool for Functional Study of Genes and Crop Improvement. **Frontiers in Plant Science**, Lausanne, v. 5, p. 463, 2014.

ODU, B. O.; ASIEDU, R.; SHOYINKA, S. A.; HUGHES, J. D. Screening of Water Yam (*Dioscorea Alata L.*) Genotypes for Reactions to Viruses in Nigeria. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 154, n. 11-12, p. 716–724, 2006.

OLIVEIRA, A. P.; FREITAS NETO, A. P.; SANTOS, E. S. Yam yield as a result of organic, mineral fertilization and harvest time. **Horticultura Brasileira**, Distrito Federal, v. 19, n. 2, p. 144–147, 2001.

OLIVEIRA, A. P.; SILVA, D. F. da; SILVA, J. A. da; OLIVEIRA, A. N. P. de; SANTOS, R. R.; SILVA, N. V. da; OLIVEIRA, F. J. M. e. Alternative technology for yam tuber-seeds production and its reflexes in the tubers yield. **Horticultura Brasileira**, Distrito Federal, v. 30, n. 3, p. 553–556, 2012.

OLIVEIRA, I. S.; MOURA, R. M.; MAIA, L. C. Considerações sobre a cultura do inhame da costa e podridão-verde, principal causa de perdas durante o armazenamento. **Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agrônômica**, Recife, v. 2, n. 1, p. 90-106, 2005

- OWEN, C.; MATHIOUDAKIS, M.; GAZIVODA, A.; GAL, P.; NOL, N.; KALLIAMPAKOU, K.; FIGAS, A.; BELLAN, A.; IPARAGUIRRE, A.; RUBIO, L.; LIVIERATOS, I. Evolution and Molecular Epidemiology of Citrus Tristeza Virus on Crete: Recent Introduction of a Severe Strain. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 162, n. 11-12, p. 839–843, 2014.
- PRABHA, K.; BARANWAL, V. K.; JAIN, R. K. Applications of Next Generation High Throughput Sequencing Technologies in Characterization, Discovery and Molecular Interaction of Plant Viruses. **Indian Journal of Virology**, Hisar, v. 24, n. 2, p. 157–165, 11 2013.
- RIESENFELD, C. S.; SCHLOSS, P. D.; HANDELSMAN, J. Metagenomics: Genomic Analysis of Microbial Communities. **Annual Review of Genetics**, Palo Alto, v. 38, p. 525–552, 2004.
- RUBIO, L.; GUERRI, J.; MORENO, P. Genetic Variability and Evolutionary Dynamics of Viruses of the Family Closteroviridae. **Frontiers in Microbiology**, Lausanne, v. 4, p. 151, 2013.
- SANFAÇON, H.; WELLINK, J.; LE GALL, O.; KARASEV, A.; VAN DER VLUGT, R.; WETZEL, T. Secoviridae: A Proposed Family of Plant Viruses within the Order Picornavirales That Combines the Families Sequiviridae and Comoviridae, the Unassigned Genera Cheravirus and Sadwavirus, and the Proposed Genus Torradovirus. **Archives of Virology**, New York, v. 154, n. 5, p. 899–907, 2009.
- SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 74, n. 12, p. 5463–5467, 1977.
- SARTIE, A.; ASIEDU, R.; FRANCO, J. Genetic and Phenotypic Diversity in a Germplasm Working Collection of Cultivated Tropical Yams (*Dioscorea* Spp.). **Genetic Resources and Crop Evolution**, Dordrecht, v. 59, n. 8, p. 1753–1765, 2012.
- SANTOS, E. S.; LACERDA, J. T.; CARVALHO, R. A.; CASSIMIRO, C. M. Produtividade e controle de nematóides do inhame com plantas antagônicas e resíduos orgânicos. **Tecnologia & Ciência Agropecuária**, João Pessoa, v. 3, n. 2, p.7-13, 2009.

- SASKI, C. A.; BHATTACHARJEE, R.; SCHEFFLER, B. E.; ASIYEDU, R. Genomic Resources for Water Yam (*Dioscorea alata* L.): Analyses of EST-Sequences, De Novo Sequencing and GBS Libraries. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 10, n. 7, p. 1-14, 2015.
- SCHLOSS, P. D.; HANDELSMAN, J. Biotechnological Prospects from Metagenomics. **Current Opinion in Biotechnology**, London, v. 14, n. 3, p. 303–310, 2003.
- SDOODIE, R.; TEAKLE, D. S. Transmission of Tobacco Streak Virus by Thrips Tabach a New Method of Plant Virus Transmission. **Plant Pathology**, Oxford, v. 36, n. 3, p. 377–380, 1987.
- SEAL, S.; MULLER, E. Molecular Analysis of a Full-Length Sequence of a New Yam Badnavirus from *Dioscorea Sansibarensis*. **Archives of Virology**, New York, v. 152, n. 4, p. 819–825, 2007.
- SEAL, S.; TURAKI, A.; MULLER, E.; KUMAR, P. L.; KENYON, L.; FILLOUX, D.; GALZI, S.; LOPEZ-MONTES, A.; ISKRA-CARUANA, M.-L. The Prevalence of Badnaviruses in West African Yams (*Dioscorea Cayenensis-Rotundata*) and Evidence of Endogenous Pararetrovirus Sequences in Their Genomes. **Virus Research**, Amsterdam, v. 186, p. 144–154, 2014.
- SEGUIN, J.; RAJESWARAN, R.; MALPICA-LÓPEZ, N.; MARTIN, R. R.; KASSCHAU, K.; DOLJA, V. V.; OTTEN, P.; FARINELLI, L.; POOGGIN, M. M. De Novo Reconstruction of Consensus Master Genomes of Plant RNA and DNA Viruses from siRNAs. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 9, n. 2, p. e88513, 2014.
- SHEPHERD, D. N.; MARTIN, D. P.; THOMSON, J. A. Transgenic strategies for developing crops resistant to geminiviruses. **Plant Science**, Shannon, v. 176, n. 1, p. 1–11, 2009.
- SILVA, G.; BÖMER, M.; NKERE, C.; KUMAR, P. L.; SEAL, S. E. Rapid and Specific Detection of Yam Mosaic Virus by Reverse-Transcription Recombinase Polymerase Amplification. **Journal of Virological Methods**, Amsterdam, v. 222, p. 138–144, 2015.
- SIQUEIRA, M. Yam: a neglected and underutilized crop in Brazil. **Horticultura Brasileira**, Distrito Federal, v. 29, n. 1, p. 16–20, 2011.
- SUSI, P. Black Currant Reversion Virus, a Mite-Transmitted Nepovirus. **Molecular Plant Pathology**, Oxford, v. 5, n. 3, p. 167–173, 2004.

THOMPSON, J. R.; KAMATH, N.; PERRY, K. L. An Evolutionary Analysis of the Secoviridae Family of Viruses. **PloS One**, San Francisco, v. 9, n. 9, p. e106305, 2014.

THOMPSON, J. R.; PERRY, K. L.; DE JONG, W. A New Potato Virus in a New Lineage of Picorna-like Viruses. **Archives of Virology**, New York, v. 149, n. 11, p. 2141–2154, 2004.

TZANETAKIS, I. E.; POSTMAN, J. D.; GERGERICH, R. C.; MARTIN, R. R. A virus between families: nucleotide sequence and evolution of Strawberry latent ringspot virus. **Virus Research**, Amsterdam, v. 121, n. 2, p. 199–204, 2006.

UMBER, M.; FILLOUX, D.; MULLER, E.; LABOUREAU, N.; GALZI, S.; ROUMAGNAC, P.; ISKRA-CARUANA, M.-L.; PAVIS, C.; TEYCHENEY, P.-Y.; SEAL, S. E. The Genome of African Yam (*Dioscorea Cayenensis*-Rotundata Complex) Hosts Endogenous Sequences from Four Distinct Badnavirus Species. **Molecular Plant Pathology**, Oxford, v. 15, n. 8, p. 790–801, 2014.

VERBEEK, M.; DULLEMANS, A. M.; VAN DEN HEUVEL, J. F. J. M.; MARIS, P. C.; VAN DER VLUGT, R. A. A. Identification and characterisation of tomato torrado virus, a new plant picorna-like virus from tomato. **Archives of Virology**, New York, v. 152, n. 5, p. 881–890, 2007.

ViralZone: root. Disponível em: <<http://viralzone.expasy.org/>>. Acesso em: 7 fev. 2016.

WU, Q.; DING, S.-W.; ZHANG, Y.; ZHU, S. Identification of Viruses and Viroids by next-Generation Sequencing and Homology-Dependent and Homology-Independent Algorithms. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 53, p. 425–444, 2015.

WYLIE, S. J.; LUO, H.; LI, H.; JONES, M. G. K. Multiple Polyadenylated RNA Viruses Detected in Pooled Cultivated and Wild Plant Samples. **Archives of Virology**, New York, v. 157, n. 2, p. 271–284, 2012.

YOO, R. H.; ZHAO, F.; LIM, S.; IGORI, D.; KIM, S.-M.; AN, T.-J.; LEE, S.-H.; MOON, J. S. The Complete Genome Sequences of Two Isolates of Cnidium Vein Yellowing Virus, a Tentative New Member of the Family Secoviridae. **Archives of Virology**, New York, v. 160, n. 11, p. 2911–2914, 2015.

YOUSSEF, F.; MARAIS, A.; FAURE, C.; BARONE, M.; GENTIT, P.; CANDRESSE, T.
Characterization of Prunus-Infecting Apricot Latent Virus-like Foveaviruses: Evolutionary
and Taxonomic Implications. **Virus Research**, Amsterdam, v. 155, n. 2, p. 440–445, 2011.

CAPÍTULO II

Detection of a new virus belonging to *Closteviridade* family in yam of Brazil

Detection of a new virus belonging to *Closteroviridae* family in yam of Brazil

Evelyn Anly Ishikawa Hayashi • Rosana Blawid • Gilvan Pio-Ribeiro • Genira Pereira de Andrade • Fernando Lucas de Melo • Tatsuya Nagata

E. A. I. Hayashi • G. Pio-Ribeiro • G. P. Andrade

Departamento de Agronomia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, 52171-900 Recife, PE, Brazil.

R. Blawid • Fernando Lucas de Melo • T. Nagata (✉)

Departamento de Biologia Celular, Laboratório de Microscopia Eletrônica, Universidade de Brasília, 70910-900 Brasília- DF, Brazil

E-mail: tatsuya@unb.br

Abstract

The yam (*Dioscorea* spp.) is an important source of food and income in many tropical and sub-tropical countries. In northeastern Brazil, the yam crop contributes to sustainability of family farms in some states and the tuber is part of the daily consumption of the population. This work reports the occurrence of a new virus species in yam producer areas in the states of Pernambuco and Paraíba, and in the Federal District, detected through the Next Generation Sequencing (NGS). The samples were subjected to a partial virus purification followed by total RNA extraction. The sequencing analysis using the BLAST program revealed that the samples contained nucleotide sequences compatible to species belonging to family *Closteroviridae*. Specific primers were synthesized in order to analyze each sample for the presence of the virus. Among the 28 samples studied, the virus was detected in 26. Due to the low nucleotide and amino acid similarity with known species, it is presumed that the virus in concern is a new viral species belonging to family *Closteroviridae*. The proposed name is *Dioscorea C virus (DVC)*.

Key words: *Dioscorea* spp., *Little cherry virus 2*, PCR, Next-Generation Sequencing

Resumo

O inhame (*Dioscorea* spp.) representa uma importante fonte de alimento e renda em diversos países tropicais e sub-tropicais. No Nordeste brasileiro, a cultura do inhame contribue para sustentabilidade da agricultura familiar em vários estados, além da túbera fazer parte do consumo cotidiano de alimentos da população. O presente trabalho relata a ocorrência de uma nova espécie viral em áreas produtoras de inhame nos estados de Pernambuco e Paraíba e no Distrito Federal, detectada através do Sequenciamento de Nova Geração (NGS). As amostras foram submetidas a uma purificação viral parcial seguido da extração total de RNA. A análise do sequenciamento, utilizando o programa BLAST, revelou que o material continha sequências nucleotídicas compatíveis com espécies pertencentes a Família *Closteroviridae*. Foram sintetizados *primers* específicos com o objetivo de analisar cada amostra quanto a presença do vírus, tendo sido encontrado em 26 das 28 amostras estudadas. Devido a baixa similaridade nucleotídica e de aminoácido com as espécies virais conhecidas, presupõe-se que o vírus em questão trata-se de uma nova espécie pertencente a família *Closteroviridae*. O nome proposto é *Dioscorea virus C* (DVC).

Palavras-chave: *Dioscorea* spp., *Little cherry virus 2*, PCR, Sequenciamento de Nova Geração

The family *Closteroviridae* comprises more than 30 plant viruses with flexuous filamentous virions of 700–2,000 nm in length and 12 nm in diameter. Members of this family represents a related group of mono- and multipartite, single-stranded, positive-sense RNA with long, flexuous virions with over 15 to almost 20 kb kb (Fayez and Mahmoud 2011). The family is divided into three genera: *Ampelovirus*, *Closterovirus* and *Crinivirus* (Bar-Joseph 2014; Naidu et al. 2015). However, it was proposed to include *Velarivirus* as a fourth genus (Ito et al. 2015). The genus distinction within *Closterividae* family is based on the type of insect vector and molecular and biological characteristics. Members of the genera *Closterovirus*, *Crinivirus* e *Ampelovirus* are, normally, transmitted by aphids, whiteflies, and mealybugs, respectively (Melzer et al. 2013).

Several members of this family cause devastating diseases. Grapevine leaf roll disease (GLRD) is one of the most prevalent viral diseases in vineyards worldwide (Lunden and Qiu 2011). The GLRD virus complex belongs to the *Closterividae* family and was recently grouped as following: genus *Closterovirus* - *Grapevine leafroll-associated virus 2* (GLRaV-2); genus *Ampelovirus* - GLRaV-1, GLRaV-3, GLRaV-4, GLRaV-5, GLRaV-6, GLRaV-8, GLRaV-9, GLRaV-Pr, GLRaV-De, GLRaV-Car; and one unassigned species - GLRaV-7 (Martelli at al. (2012).

Another virus of significant agronomic importance is the *Citrus tristeza virus* (CTV) being present in the major citrus regions of the world, causing rapid death of the infected plant (Bak and Folimonova 2015).

Yams (*Dioscorea* spp.) are one of the most important food commodities in the tropics and subtropics. The genus *Dioscorea* comprises more than 600 species. However only ten are generally cultivated for food production: *D. alata* L. (water yam, greater yam), *D. rotundata* Poir. (white yam, white guinea yam), *D. cayenensis* Lam. (yellow yam, yellow guinea yam), *D. bulbifera* L., *D. esculenta* (Lour.) Burk., *D. opposita* Thunb., *D. japonica* Thunb., *D.*

nummularia Lam., *D. pentaphylla* L., and *D. trifida* L. (Sartie et al. 2012; Mambole et al. 2014).

Yam is vegetatively propagated through its tubers. This facilitates the accumulation of pathogens, particularly viruses, affecting the development of the tubers (Siqueira 2011; Cornet et al. 2014). At least 26 different species belonging to nine virus genera (*Aureusvirus*, *Badnavirus*, *Carlavirus*, *Comovirus*, *Cucumovirus*, *Fabavirus*, *Macluravirus*, *Potexvirus* e *Potyvirus*) have been reported infecting plants of yam worldwide to date (Seal et al. 2014; Mambole et al. 2014).

The objective of present study was to determine, through the Next Generation Sequencing, which viruses infect yam plants from different locations of Brazil. Samples tissue of 28 plants showing typical virus symptoms were collected in the states of Pernambuco and Paraíba, and in the Federal District.

The samples were processed together and submitted to partial virus purification according to the protocol of Cali (1981) with modifications. Of each sample, 2 g of leaf with symptoms were used. The homogenization of the samples was performed with 0.1 M borate buffer pH 8.0 in the ratio of 1: 4 (w/v) with the addition of 0.2 % 2-Mercaptoethanol. Clarification was made with the addition of 1/3 volume of chloroform to the filtrates, followed by centrifugation for 30 min. at 5,000 g. To the supernatants, 0.2 % of Triton solution was added, followed by agitation for 1 hour in cold chamber. The samples were centrifuged for 30 min at 5,000 g and the supernatants were laid on sucrose cushion (20% solution) in 0.05M borate buffer pH 8.0 (in the ratio 1:3). Then, the samples were subjected to centrifugation of 142,000 g for 1 hour to form the pellet used to continue the RNA extraction process.

Total RNA was isolated from the semi-purification product using the TRIzol Reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) and sequenced on an Illumina HiSeq 2000 with 100 base paired-end performed by Macrogen Inc. (Seoul, South Korea). The reads were assembled

using the CLC Genomics Workbench 6.5 (<http://www.clcbio.com>), and contigs were assembled using Geneious R7.1 (<http://www.geneious.com/>).

Contigs were analyzed by BLASTx searches against the viral reference genome database (RefSeq) in GenBank. Among the assembled contigs, one contig of 944 bp in length were picked up as coat protein (p55) of *Little cherry virus 2* (LChV-2) sequences (GenBank accession no. NP 891565) with maximum amino acid sequence similarity of 47% (with 99% coverage).

To produce the genomic cDNA, initially the total RNA was extracted from each sample individually using Plant RNA reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). The first strand cDNA was synthesized using the Superscript III reverse transcriptase (Invitrogen) standard protocol, with the reverse primer made from a contig region (5'-GTAGTTGTCTGCATTAGTYACCTCAC-3') by incubation at 52 °C for 1 hour.

The DNA amplification was performed using specific primers made from a contig region, 66 For (5'-GATACAAGGAGTTCAAGTCAGTTAC-3') and 405 Rev (5'-G TGG ATG CAG TTG GTA TGT C-3'). Among 28 samples tested, there was expected size amplification (340 bp) (Fig. 1) for of 26 samples (Tab. 1): 22 from Pernambuco State, two from Paraíba State and two from Federal District (Fig. 2).

Due to low identity presented with LChV-2 we conclude that the virus in question is a new species belonging to family *Closteroviridae*. The tentative name *Dioscorea virus C* (DVC) is proposed for this new virus encountered in yam in Brazil.

References

- Bak A, Folimonova SY (2015) The conundrum of a unique protein encoded by citrus tristeza virus that is dispensable for infection of most hosts yet shows characteristics of a viral movement protein. *Virology* 485:86–95. doi: 10.1016/j.virol.2015.07.005
- Bar-Joseph M (2014) Closteroviridae: the beginning. *Front Microbiol.* doi: 10.3389/fmicb.2014.00014
- Cali BB (1981) Purification, Serology, and Particle Morphology of Two Russet Crack Strains of Sweet Potato Feathery Mottle Virus. *Phytopathology* 71:302. doi: 10.1094/Phyto-71-302
- Cornet D, Sierra J, Tournebize R, Ney B (2014) Yams (*Dioscorea* spp.) plant size hierarchy and yield variability: Emergence time is critical. *Eur J Agron* 55:100–107. doi: 10.1016/j.eja.2014.02.002
- Fayez KA, Mahmoud SY (2011) Detection and partial characterization of a putative closterovirus affecting *Ficus carica*: molecular, ultrastructural and physiological aspects of infected leaves. *Acta Physiol Plant* 33:2187–2198. doi: 10.1007/s11738-011-0758-0
- Filho F de ACR, Nicolini C, Resende R de O, et al (2013) The complete genome sequence of a Brazilian isolate of yam mild mosaic virus. *Arch Virol* 158:515–518. doi: 10.1007/s00705-012-1509-2
- Ito T, Sato A, Suzaki K (2015) An assemblage of divergent variants of a novel putative closterovirus from American persimmon. *Virus Genes* 51:105–111. doi: 10.1007/s11262-015-1202-0
- Lunden S, Qiu W (2011) First Report of Grapevine leafroll-associated virus 2 in a Hybrid Grape “Vidal Blanc” in Missouri. *Plant Dis* 96:462–462. doi: 10.1094/PDIS-10-11-0834
- Mambole IA, Bonheur L, Dumas LS, et al (2014) Molecular characterization of yam virus X, a new potexvirus infecting yams (*Dioscorea* spp) and evidence for the existence of at least three distinct potexviruses infecting yams. *Arch Virol* 159:3421–3426. doi: 10.1007/s00705-014-2211-3

Matz M, Shagin D, Bogdanova E, et al (1999) Amplification of cDNA ends based on template-switching effect and step-out PCR. *Nucleic Acids Res* 27:1558–1560. doi: 10.1093/nar/27.6.1558

Melzer M, Sugano J, Uchida J, et al (2013) Molecular characterization of closteroviruses infecting *Cordyline fruticosa* L. in Hawaii. *Virology* 4:39. doi: 10.3389/fmicb.2013.00039

Naidu RA, Maree HJ, Burger JT (2015) Grapevine leafroll disease and associated viruses: a unique pathosystem. *Annu Rev Phytopathol* 53:613–634. doi: 10.1146/annurev-phyto-102313-045946

Seal S, Turaki A, Muller E, et al (2014) The prevalence of badnaviruses in West African yams (*Dioscorea cayenensis-rotundata*) and evidence of endogenous pararetrovirus sequences in their genomes. *Virus Res* 186:144–154. doi: 10.1016/j.virusres.2014.01.007

Siqueira M (2011) Yam: a neglected and underutilized crop in Brazil. *Hortic Bras* 29:16–20. doi: 10.1590/S0102-05362011000100003

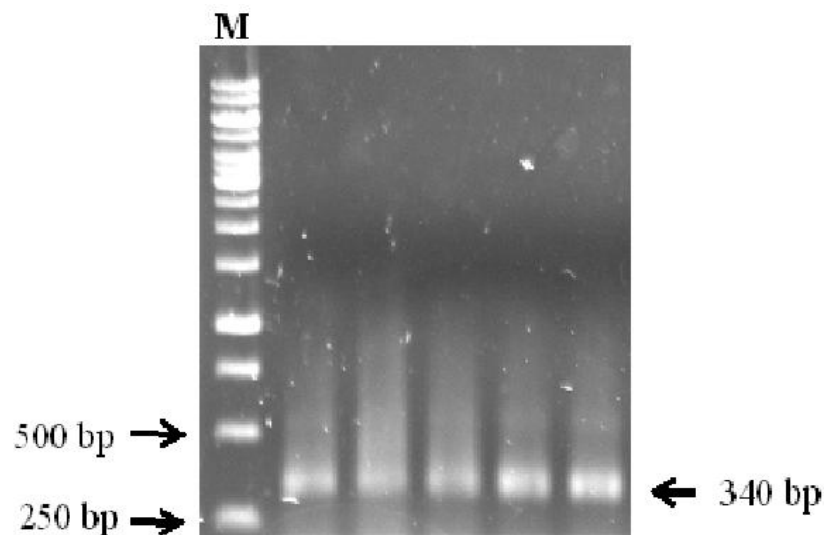


FIGURE 1- RT-PCR products visualized in agarose gel. Positive amplification (340 bp) of some samples were tested for detection of *Dioscorea virus C* (DVC).



FIGURE 2- Map of Brazil showing the places with positive samples for Dioscorea virus C (DVC). PB = Paraíba state, PE = Pernambuco state, and DF = The Federal District.

TABLE 1- Samples analyzed in this study and respective region of origin and the result of the detection.

Sample	Locality (County - State)	Detection
A1.1	Goiana - PE	Positive
A1.2	Goiana - PE	Positive
A1.3	Itapissuna - PE	Positive
A1.4	Itapissuna - PE	Negative
A1.5	Conde - PB	Positive
A1.6	Alhandra - PB	Positive
A1.7	Abreu e Lima - PE	Positive
A1.8	Núcleo Rural Vargem Bonita - DF	Positive
A1.9	Núcleo Bandeirantes - DF	Positive
A1.11	Goiana - PE	Positive
A1.12	Goiana - PE	Positive
A2.1	Bonito - PE	Positive
A2.2	Bonito - PE	Positive
A2.3	Bonito - PE	Positive
A2.4	Bonito - PE	Positive
A2.5	Bonito - PE	Positive
A2.6	Bonito - PE	Positive
A2.7	Bonito - PE	Positive
A2.8	Bonito - PE	Positive
A2.9	Bonito - PE	Positive
A3.1	Ferreiro - PE	Negative
A3.2	Ferreiro - PE	Positive
A3.3	Ferreiro - PE	Positive
A3.4	Ferreiro - PE	Positive
A3.5	Ferreiro - PE	Positive
A3.6	Ferreiro - PE	Positive
A3.7	Ferreiro - PE	Positive
A3.8	Ferreiro - PE	Positive

CAPÍTULO III

Complete genome sequence of a new secovirus infecting *Dioscorea* plant

Complete genome sequence of a new secovirus infecting *Dioscorea* plant

Evelyn Anly Ishikawa Hayashi¹; Rosana Blawid²; Fernando Lucas de Melo²; Miguel Souza Andrade²; Gilvan Pio-Ribeiro¹; Genira Pereira de Anndrade¹; Tatsuya Nagata²

¹Laboratório de Fitovirologia, Departamento de Agronomia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, CEP 52171-900, Recife, PE, Brazil

²Laboratório de Microscopia Eletrônica, Departamento de Biologia Celular, Universidade de Brasília, Brasília, DF CEP 70910-900, Brazil

Correspondence to: tatsuya@unb.br

Abstract

The complete genome sequence of a new virus infecting a yam plant exhibiting virus symptoms in Brazil was determined. The genome of this virus is composed of bi-segmented RNAs in positive sense (5979 and 3860 nucleotides in length, respectively) without counting the poly(A) tails. One large open reading frame in each genome segment (RNA1-ORF1 and RNA2-ORF2) was predicted. BLAST searches of protein databases showed that RNA1-ORF1 and RNA2-ORF2 have higher amino acid sequence identities of 40 h% and 29 % to the RNA1-ORF1 and RNA2-ORF2 of Chocolate lily virus A (CLVA, a recently identified as unassigned member of the family *Secoviridae*), respectively. Phylogenetic analysis showed that the virus was clustered in unassigned species group in the *Secoviridae*. The secovirus sequenced in this study is most possibly a new member of the family *Secoviridae*. The tentative name Dioscorea virus S (DVS) is proposed for this new virus.

Resumo

A sequência completa do genoma de um novo vírus, encontrado em planta de inhame apresentando sintomas virais no Brasil, foi determinada. O genoma é constituído por RNA bi-segmentado em sentido positivo (5979 e 3860 nucleótidos de comprimento, respectivamente), sem contar as caudas poli (A). Uma ampla fase aberta de leitura em cada segmento do genoma (RNA1 - ORF1 e RNA2 - ORF2) foi previsto. Pesquisas utilizando o banco de dados de proteínas do BLAST mostraram que RNA1 - ORF1 e RNA2 - ORF2 têm alta identidade de sequência de aminoácidos de 40% e 29% com o RNA1 - ORF1 e RNA2 - ORF2, respectivamente, do Chocolate lily virus (CLVA, um recentemente membro não classificado da família *Secoviridae*). A análise filogenética mostrou que o vírus foi agrupado juntamente com espécies não classificadas da família *Secoviridae*. O secovirus sequenciado neste estudo é, possivelmente, um novo membro da família *Secoviridae*. O nome provisório Dioscorea virus S (DVS) é proposto para este novo vírus.

Members of the family *Secoviridae* have one or two genomic RNA segments in positive sense. Each genomic segment has a VPg (virus protein genome linked) linked to its 5' end and a 3' poly(A) tract in termini. In the family members with two genomic RNA molecules, RNA1 and RNA2 are translated into two polyproteins: RNA1 contains one large open reading frame (ORF) predicted to encode proteins necessary for replication and RNA2 contains one or two ORF(s) predicted to encode one or two coat proteins (CP) and movement protein (MP) [1]. The family *Secoviridae* are divided into eight genera (*Comovirus*, *Fabavirus*, *Nepovirus*, *Sequivirus*, *Waikavirus*, *Cheravirus*, *Sadwavirus*, and *Torradovirus*) and some species are not classified into none of these genera, classified as unassigned species group [2].

Yam (*Dioscorea* spp.) is an annual herbaceous plant belongs to monocot class, *Dioscorea* genus of Dioscoreaceae family. Yam plant are commonly propagated vegetatively and its cultivation for the consumption of their tubers is common in Africa, Latin America and the Caribbean countries [3]. In Brazil the largest yam production is mainly concentrated in the Northeast region of the Country where it has significant socio-economic importance [4].

The leaf samples were collected from 30 *Dioscorea* plants that showed viral-like symptoms in the Brazilian states of Pernambuco, Paraíba and the Federal District (Brasília). To identify viral species in the samples by the Next generation sequencing (NGS), the virus-rich fraction was prepared from the pooled leaf samples of 30 plants and total RNA was extracted from this fraction. Briefly, the virus were partially purified from the pooled samples according to the protocol of Cali & Moyer (1981) [5] with modifications. Total RNA was isolated from the pellet of the semi-purification using the ZR Plant RNA MiniPrep kit (Zymo Research, Irvine, CA, USA) following the manufacturer's protocol. The total RNA was sequenced on an Illumina HiSeq 2000 with 100 base paired-end at Macrogen Inc. (Seoul, South Korea). The reads were assembled using the CLC Genomics Workbench 6.5 (<http://www.clcbio.com>), and contigs were assembled using Geneious R7.1 (<http://www.geneious.com/>). Contigs were analyzed by BLASTx and protein BLAST searches against the viral reference genome database (RefSeq) in GenBank. Among the assembled contigs, two contigs (5963 bp and 3942 bp in length, respectively) were picked up as secovirus sequences, and tentatively it was named as *Dioscorea* virus S.

To confirm the NGS results, the full-length contigs were amplified by Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) using the selected isolate from the State of Pernambuco (PE-81). The cDNA was synthesized using Superscript III reverse

transcriptase (Life Technologies, Grand Island, NY, USA) using the oligo-d(T)₅₀M10 for the both RNA segments (5'- GCAGTGTTATCAACGCAGAT₅₀ -3'). The PCR was performed using the specific forward primers (5'- TGC GTACAACCACCGATCTTTA -3' for amplification of the RNA1 segment and 5'- CTTGCCAATCAATGTCCTTTAGGC -3' for amplification of the RNA2 segment) and the reverse anchor primer M10a (GCAGTGTTATCAACGCAGA). To obtain complete genome sequences, the cDNAs of 5' terminus of each RNA segment were amplified by the modified method of the rapid amplification of cDNA ends (RACE) protocol [6] using specific reverse primers for the RNA1 (PCR primer 5' - CAGCCAATCGAAACCATCCAAGAT - 3' and nested primer 5' - CAACGTCAGGATGTATCACCTC - 3') and RNA2 (PCR primer 5' - TGAACGCCTACCTCTATAAAGCG - 3' and nested primer 5' - CTCTATGCGCTTGCTAAGTTCATG - 3'). The assembled full-length sequences of the RNA1 (KU215538) and RNA2 (KU215539) segments were 5979 and 3860 nucleotides (nt) in length, respectively, without counting the poly(A) tail. RNA1 contains one large ORF (RNA1-ORF1) of 5663 nt, encoding a predicted polyprotein (201 kDa) carrying replication-related motifs. The putative cleavage sites between peptide in the polyprotein encoded by RNA1 was the dipeptide Q/S for the Helicase (Hel), Q/G for the Protease (Pro) and the Q/S for the RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) (Fig. 1A). The 5' and 3' untranslated regions (UTRs) of RNA1 are 148 and 151 nt in length, respectively. RNA2 contains one ORF (RNA2- ORF2) of 3590 nt, encoding a predicted polyprotein (134 kDa) of the capsid protein and product(s) involved in cell-to-cell movement the has putative cleavage site S/G (Fig. 1B). The 5' and 3' UTRs of RNA2 are 72 and 62 nt in length, respectively. The analyses of BLASTx indicated that the first ORF in RNA1 has higher nucleotide sequence identities of 40% to unnamed protein of RNA1 (YP004936170) of Chocolate lily virus A (CLVA) and the second ORF in RNA2 with 29% to unnamed protein of RNA 2 (YP004936171) of CLVA.

This virus genome was positioned in the phylogenetic tree constructed based on RNA1 and RNA2 nt sequences, with other unassigned secovirus group (Fig. 2) provisory separated by the International Committee on the Taxonomy of Viruses (ICTV) [7–9]. The genome organization of DVS is also analogous to those of this group of the family *Secoviridae*. The phylogenetic tree based on nucleotide sequences of ORF1 and ORF2 of DVS and other members of the family *Secoviridae*, indicated that DVS is most closely related to CLVA and other unassigned species (Fig. 2 A and B). The ICTV criteria for species demarcation in the family *Secoviridae* stipulate that amino acid sequence identity has been >80% in the protease-polymerase (Pro-Pol) region or >75% in CP are required [10]. The amino acid sequence

identities of the Pro-Pol region between the protease CG motif and the RdRp GDD motif (CG/GDD) of RNA1 and the CP region of RNA2 to DVS with others unassigned members of the family *Secoviridae* were in the range of 55–43% and 29–22%, respectively. Therefore, we concluded that the full genome sequences (RNA1 and RNA2) are of a novel unassigned member of the family *Secoviridae*. The tentative name Dioscorea virus S (DVS) is proposed for this new virus encountered in Brazil.

The presence of DVS was determined by RT-PCR with 30 Dioscorea samples using the detection specific primers forward (5'- TATCTACAAAATCGTCGGAGGAAC -3') and reverse (5'- TCAATCTCAGAAAAGGGCATGTG - 3'). Among the 30 samples analyzed, DVS was detected in 20 samples DVS from the states of Paraíba and Pernambuco (Tab. 1).

References

1. Sanfaçon H, Wellink J, Le Gall /O, et al. (2009) Secoviridae: a proposed family of plant viruses within the order Picornavirales that combines the families Sequiviridae and Comoviridae, the unassigned genera Cheravirus and Sadwavirus, and the proposed genus Torradovirus. Arch Virol 154:899–907. doi: 10.1007/s00705-009-0367-z
2. ICTV Virus Taxonomy 2014. <http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp>. Accessed 22 Nov 2015
3. Saski CA, Bhattacharjee R, Scheffler BE, Asiedu R (2015) Genomic Resources for Water Yam (*Dioscorea alata* L.): Analyses of EST-Sequences, De Novo Sequencing and GBS Libraries. PLoS ONE. doi: 10.1371/journal.pone.0134031
4. Filho F de ACR, Nicolini C, Resende R de O, et al. (2013) The complete genome sequence of a Brazilian isolate of yam mild mosaic virus. Arch Virol 158:515–518. doi: 10.1007/s00705-012-1509-2
5. Cali BB (1981) Purification, Serology, and Particle Morphology of Two Russet Crack Strains of Sweet Potato Feathery Mottle Virus. Phytopathology 71:302. doi: 10.1094/Phyto-71-302
6. Matz M, Shagin D, Bogdanova E, et al. (1999) Amplification of cDNA ends based on template-switching effect and step-out PCR. Nucleic Acids Res 27:1558–1560. doi: 10.1093/nar/27.6.1558

7. Wylie SJ, Luo H, Li H, Jones MGK (2012) Multiple polyadenylated RNA viruses detected in pooled cultivated and wild plant samples. *Arch Virol* 157:271–284. doi: 10.1007/s00705-011-1166-x
8. Lindner JL, Schoen CD, Jelkmann W, Leone G, Thompson JR. (2002) Characterization and complete nucleotide sequence of Strawberry mottle virus: a tentative member of a new family of bipartite plant picorna-like viruses. *J Gen Virol* 83:229–239. doi: 10.1099/0022-1317-83-1-229
9. Halgren A, Tzanetakis IE, Martin RR (2007) Identification, Characterization, and Detection of Black raspberry necrosis virus. *Phytopathology* 97:44–50. doi: 10.1094/PHYTO-97-0044
10. King AMQ, Adams MJ, Carstens EB, Lefkowitz EJ (2012) *Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses : Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Elsevier

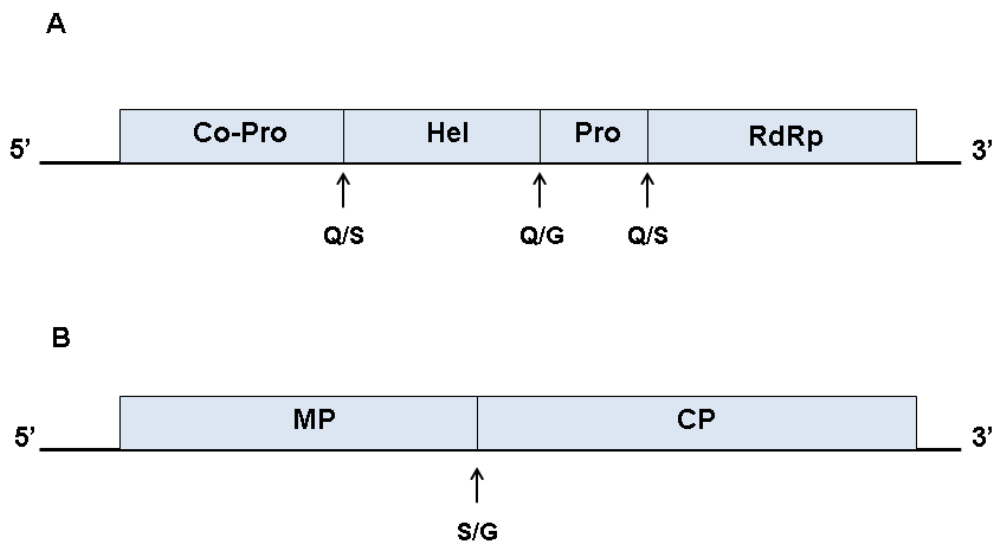


Fig. 1 Schematic representation of genomic organization of *Dioscorea* virus S RNA1 (A) and RNA2 (B). Co-Pro= Protease co-factor; Hel= Helicase; Pro= Protease; RdRp= RNA-dependent RNA polymerase; MP= Movement Protein; CP= Coat Protein.

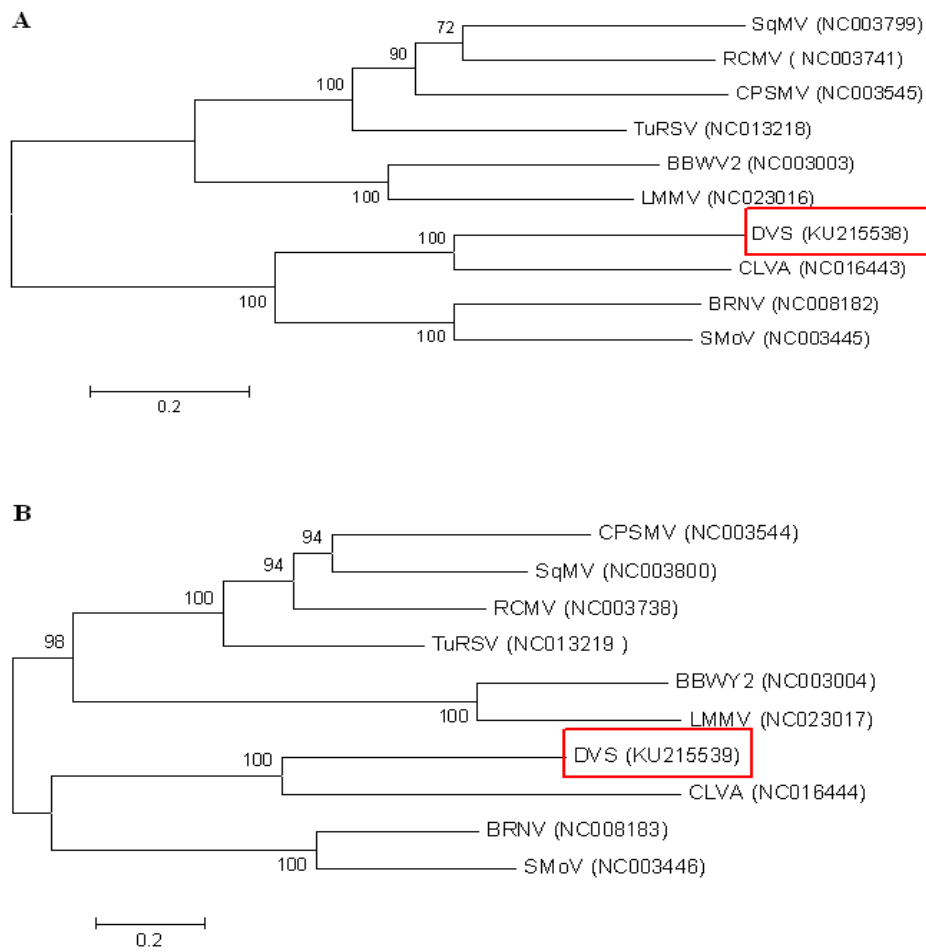


Fig. 2 Phylogenetic relationship of Dioscorea virus S to other members of the family *Secoviridae*. Phylogenetic trees were constructed using the maximum-likelihood (ML) method with the MEGA 6 program. Phylogenetic tree based on full-length nucleotide sequences of RNA1 (A) and RNA2 with their respective GenBank accession numbers (B).

Table 1 Samples analyzed in this study and respective region of origin and the result of the detection.

Sample	Locality (County - State)	Detection
A1.1	Goiana - PE	Positive
A1.2	Goiana – PE	Positive
A1.3	Itapissuna - PE	Positive
A1.4	Itapissuna – PE	Negative
A1.5	Conde – PB	Negative
A1.6	Alhandra – PB	Negative
A1.7	Abreu e Lima – PE	Positive
A1.8	Núcleo Rural Vargem Bonita - DF	Negative
A1.9	Núcleo Bandeirantes – DF	Negative
A1.10	Goiana – PE	Positive
A1.11	Goiana – PE	Positive
A1.12	Goiana – PE	Positive
A1.13	Goiana – PE	Positive
A2.1	Bonito – PE	Negative
A2.2	Bonito – PE	Positive
A2.3	Bonito – PE	Positive
A2.4	Bonito – PE	Positive
A2.5	Bonito – PE	Positive
A2.6	Bonito – PE	Positive
A2.7	Bonito – PE	Negative
A2.8	Bonito – PE	Negative
A2.9	Bonito – PE	Negative
A3.1	Ferreiro – PE	Positive
A3.2	Ferreiro – PE	Negative
A3.3	Ferreiro – PE	Positive
A3.4	Ferreiro – PE	Positive
A3.5	Ferreiro – PE	Positive
A3.6	Ferreiro – PE	Positive
A3.7	Ferreiro – PE	Positive
A3.8	Ferreiro – PE	Positive

CAPÍTULO IV

Complete genome sequence of a new foveavirus infecting *Dioscorea* plant

Complete genome sequence of a new foveavirus infecting *Dioscorea* plant

Evelyn Anly Ishikawa Hayashi¹; Rosana Blawid²; Fernando Lucas de Melo²; Miguel Souza Andrade²; Gilvan Pio-Ribeiro¹; Genira Pereira de Anndrade¹; Tatsuya Nagata²

¹Laboratório de Fitovirologia, Departamento de Agronomia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, CEP 52171-900, Recife, PE, Brazil

²Laboratório de Microscopia Eletrônica, Departamento de Biologia Celular, Universidade de Brasília, Brasília, DF CEP 70910-900, Brazil

Correspondence to: tatsuya@unb.br

Abstract

Total RNAs of partial viral purification from *Dioscorea* samples gathered from the states of Paraíba and Pernambuco and from the Federal District of Brazil were analyzed by a high throughput sequencing approach. Contigs annotations revealed the presence of a potential new virus. Its genome was fully sequenced by direct sequencing of RT-PCR fragments from one single plant. Sequences of the 5' and 3' terminus were determined by RACE protocols. The genome of this virus is composed of single-molecule RNA (7,632 bp) carrying poly(A) tails. The genomic RNA contain five open reading frames in the positive polarity that encode putative RNA-dependent RNA polymerase (RdRp), triple gene block (TGB) and one coat protein (CP). The pairwise analysis of RdRp and CP showed the maximum amino acid sequence identities of 70% with RdRp of *Apple stem pitting virus* (ASPV) and 34 % with the CP of *Cherry twisted leaf associated virus* (CTLaV), respectively. Its genomic organization is similar to the members of *Foveavirus* genus. The phylogenetic trees reconstructed with the nucleotide sequences of replicases and coat proteins of the *Betaflexiviridae* members family suggest that the new virus should be considered as a new species, for which the name of *Dioscorea virus F* (DVF) has been proposed

Resumo

RNAs totais a partir da purificação viral parcial de amostras de *Dioscorea* coletadas nos estados da Paraíba e Pernambuco e no Distrito Federal do Brasil foram analisados por sequenciamento utilizando abordagem de alto rendimento. Características dos contigs revelou a presença de um potencial novo vírus. Seu genoma foi completamente sequenciado através do sequenciamento direto dos fragmentos obtidos por RT-PCR a partir de uma única planta. Sequências das extremidades 5' e 3' foram determinados por protocolos de RACE. O genoma do vírus é constituído por uma única molécula de RNA (7.632 pb) com cauda poli (A). O RNA genômico é composto por cinco fases abertas de leitura na polaridade positiva que codificam uma putativa RNA polimerase dependente de RNA (RdRp), “triple gene block” (TGB) e uma proteína capsidial (CP). A análise do emparelhamento da RdRp e CP mostrou identidades máxima de sequências de aminoácidos de 70% com RdRp de *Apple stem pitting virus* (ASPV) e 34% com a CP de *Cherry twisted leaf-associated virus* (CTLaV), respectivamente. A sua organização genômica é semelhante aos membros do gênero *Foveavirus*. As árvores filogenéticas reconstruídas com as sequências de nucleotídios da replicases e capa proteica dos membros da família *Betaflexiviridae* sugerem que o novo vírus deve ser considerada como uma nova espécie, para a qual foi proposto o nome *Dioscorea virus* F (DVF).

Members of *Foveavirus* genus have single strand genomic RNA in positive sense, belong to *Betaflexiviridae* family [1]. Species of the genus are characterized by naturally infecting woody host plants, grapevine in the case of *Ruspestris stem pitting-associated virus* and temperate fruit crops of the *Maloideae* and *Prunoideae* families for all other members or possible members known to date. The type member of the genus, *Apple stem pitting virus* (ASPV), is known to infect species as apple, pear and quince [2, 3]. The distinguishing properties of the genus includes numbers of ORFs (should be 5), the presence of triple gene block (movement protein) and the size of the coat protein (28 – 44 kDa) and replication protein (230 – 250 kDa) [4].

The yam (*Dioscorea* spp.) is one of the main tubers crops produced in the tropics and subtropics regions in the world, behind only cassava (*Manihot esculenta*) and sweet potatoes (*Ipomoea batatas*) [5]. The genus *Dioscorea* includes more than 600 species, however only ten are generally cultivated as food [6]. At least nine virus genera (*Aureusvirus*, *Badnavirus*, *Carlavirus*, *Comovirus*, *Cucumovirus*, *Fabavirus*, *Macluravirus*, *Potexvirus* e *Potyvirus*) was reported infecting plants of yam worldwide [5]. In Brazil the largest yam production is mainly concentrated in the northeast region of the Country where it has socio-economic importance, constituting a source of employment and income for the local population [7, 8].

For the analysis of viruses infecting yam plants by high throughput sequencing the virus-rich fraction was prepared from the pooled leaf samples of 30 plants collected in the Brazilian states of Pernambuco and Paraíba and in the Federal District (Brasília) according to the protocol of Cali (1981) [9] with modifications. Total RNA was extracted from the pellet of the semi-purification using the ZR Plant RNA MiniPrep kit (Zymo Research, Irvine, CA, USA) following the manufacturer's protocol and was sequenced on an Illumina HiSeq 2000 with 100 base paired-end at Macrogen Inc. (Seoul, South Korea). The reads were assembled using the CLC Genomics Workbench 6.5 (<http://www.clcbio.com>), and the contigs were assembled using Geneious R7.1 (<http://www.geneious.com/>). The BLASTx and protein BLAST searches against the viral reference genome database (RefSeq) in GenBank of the contigs showed the sequences belonging to foveavirus.

To determine the full genome sequence the cDNA fragments of genome were amplified by the reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) using the selected isolate from the State of Pernambuco (PE-5.1). The cDNA was synthesized using Superscript III reverse transcriptase (Life Technologies, Grand Island, NY, USA) using the oligo-d(T)₅₀M10 (5'- GCAGTGGTTATCAACGCAGAT₅₀-3'). To obtain the complete genome was

performed three PCRs: (1) to obtain the 3' terminus was using the specific forward primers (5'-AATGATCTTTATGCAGAGGARGC - 3') and the reverse anchor primer M10a (5' – GCAGTGTTATCAACGCAGA – 3'), resulting 3,210 kb fragments from 3' end; (2) to obtain the fragment that comprises the 719 nt into 4,949 nt sequences using specific primers forward (5'-GCTGCTGGCAACAGTAGTA-3') and reverse (5'-CGTAAACCTCATGATGGC AAAAC – 3'); (3) the region of 5' end using specific primers forward (5'-CTAAGTGTCTTCACAATGTCAGACCCT-3') and reverse (5'-GATTCATGTGCTTTTCCATCAGGTGA-3'). To obtain the cDNAs of 5' terminus, the 5' RACE protocol (System for Rapid Amplification of cDNA Ends kit, Invitrogen) was performed according to manufacturer's instructions using for the PCR Abridged Anchor Primer forward (5'-GGCCACGCGTCGACTAGTACGGGIIGGGIIGGGIIG-3') and specific reverse primers (5'- TTACAGACAGGATGCGAATGAGGCATAC - 3'). For the nested PCR was used Abridged Universal Amplification Primer (AUAP) as forward primer (5'-GGCCACGCGTCGACTAGTAC-3') and specific reverse nested primer (5'-CCACATTGTTTATCTTGTGAATGGCCTCTG-3')

The assembled full-length sequences was 7,632 nucleotides (nt) in length, without counting the poly(A) tail. The genomic RNA contains five ORFs. The ORF 1 contains 5,453 nt, encoding a predicted polyprotein (~207 kDa) carrying replication-related motifs. The ORFs two, three and four (Triple gene block) contains 701, 347 and 197 nt in length, respectively, encodings predicted proteins involved in cell-to-cell movement (approximately 26, 13 and 7 kDa, respectively). ORF 5 contains 710 nt, encoding a predicted capsid protein (26.7 kDa). The 5' untranslated region (UTR) comprises 53 nt and the 3' UTR 162 nt. The pairwise analyses based on the complete genome has the higher sequence identities of 70 % with ASPV (GenBank accession no. KF915809).

The ICTV criteria for the species demarcation in the genus *Foveavirus* stipulate that amino acid identity less than 80 % or nucleotide identity less than 72 % in CP or polymerase genes [4]. Therefore, we concluded that the full genome sequence detected in this work belongs to a novel member of the genus *Foveavirus*. The tentative name *Dioscorea virus F* (DVF) is proposed for this new virus encountered in Brazil.

A phylogenetic tree was constructed by the maximum likelihood (ML) method implemented using a nucleotide sequence alignment generated by MEGA 5.1 program. This virus was positioned in the phylogenetic tree based on ORF1 and ORF5 with other foveavirus species (Fig. 1). The genome organization of DVF (KU659021) is also analogous to those of members belonging to the genus *Foveavirus* (Fig. 2). The ORF1 of DVF has higher amino

acid sequence identities of 70 % with the RdRp protein of ASPV (accession GenBank no. AEP02955) and the ORF5 34 % with the coat protein of Cherry twisted leaf associated virus (CTLaV) (AHA59496).

The presence of DVF was determined by RT-PCR with 30 *Dioscorea* samples using the detection specific primers forward (5'-AATGATCTTTATGCAGAGGARGC-3') and reverse (5'-CGTAAACCTCATGATGGCAAAC-3'). Among the 30 samples analyzed, DVF was detected in 19 samples DVF from the states of Paraíba, Pernambuco and the Federal District (Tab. 1). The results showed that the wide geographic distribution of DVF in Brazil.

References

1. ICTV Virus Taxonomy 2014. <http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp>. Accessed 22 Nov 2015
2. Youssef F, Marais A, Faure C, et al. (2011) Characterization of Prunus-infecting apricot latent virus-like Foveaviruses: evolutionary and taxonomic implications. *Virus Res* 155:440–445. doi: 10.1016/j.virusres.2010.11.013
3. Meng B, Venkataraman S, Li C, et al. (2013) Construction and biological activities of the first infectious cDNA clones of the genus Foveavirus. *Virology* 435:453–462. doi: 10.1016/j.virol.2012.09.045
4. King AMQ, Adams MJ, Carstens EB, Lefkowitz EJ (2012) *Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses : Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Elsevier
5. Seal S, Turaki A, Muller E, et al. (2014) The prevalence of badnaviruses in West African yams (*Dioscorea cayenensis-rotundata*) and evidence of endogenous pararetrovirus sequences in their genomes. *Virus Res* 186:144–154. doi: 10.1016/j.virusres.2014.01.007
6. Mambole IA, Bonheur L, Dumas LS, et al. (2014) Molecular characterization of yam virus X, a new potexvirus infecting yams (*Dioscorea* spp) and evidence for the existence of at least three distinct potexviruses infecting yams. *Arch Virol* 159:3421–3426. doi: 10.1007/s00705-014-2211-3

7.Oliveira AP, Neto F, A P, Santos ES (2001) Yam yield as a result of organic, mineral fertilization and harvest time. *Hortic Bras* 19:144–147. doi: 10.1590/S0102-05362001000200010

8.Siqueira M (2011) Yam: a neglected and underutilized crop in Brazil. *Hortic Bras* 29:16–20. doi: 10.1590/S0102-05362011000100003

9.Cali BB (1981) Purification, Serology, and Particle Morphology of Two Russet Crack Strains of Sweet Potato Feathery Mottle Virus. *Phytopathology* 71:302. doi: 10.1094/Phyto-71-302

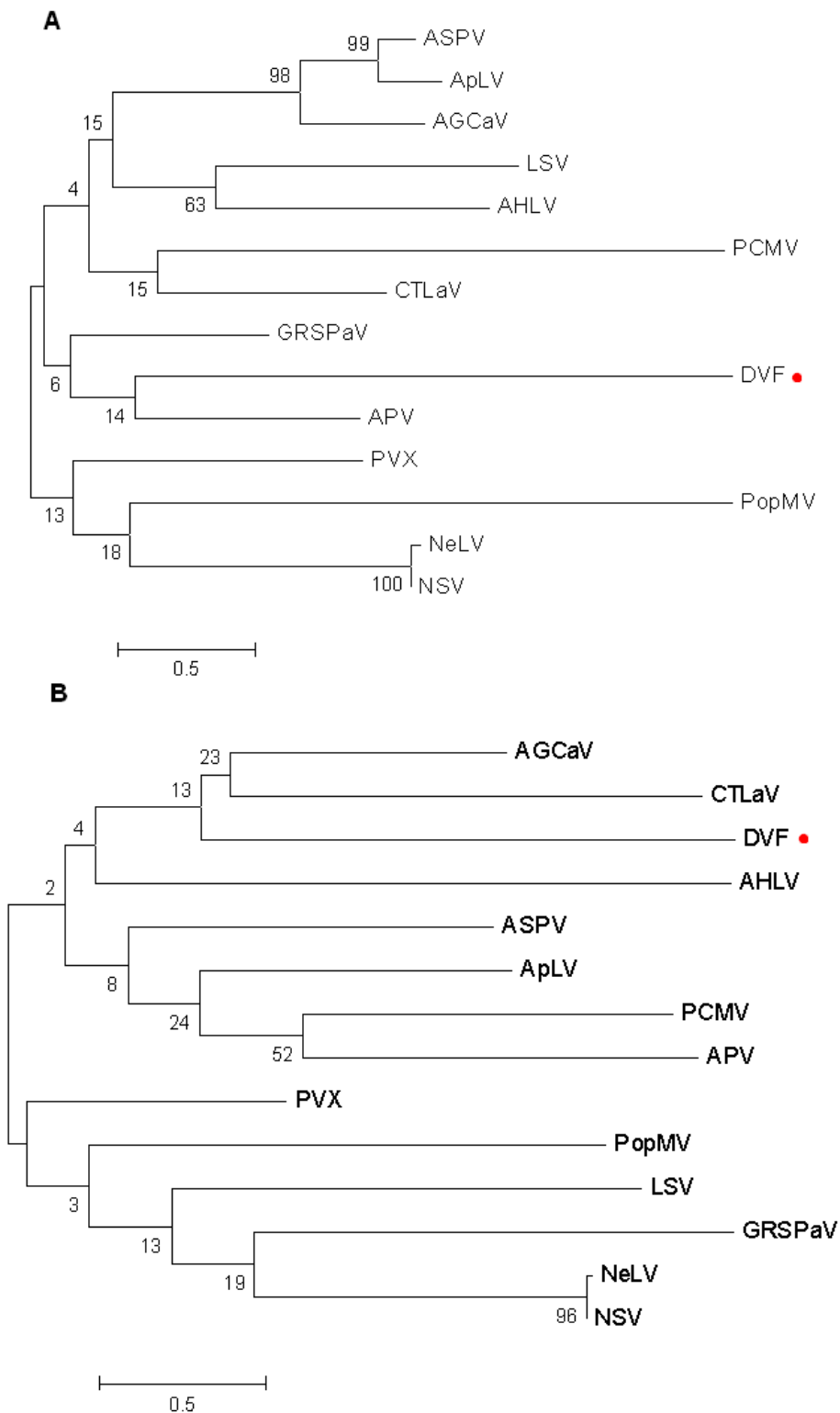


Fig. 1 Phylogenetic relationship of Dioscorea virus F (DVF) to other species in the genus *Foveavirus*. Phylogenetic trees were constructed using the maximum-likelihood (ML) method with the MEGA 6 based on RdRp (A) and CP nucleotide sequences (B). *Potato virus X* (PVX) was defined for outgrouping. DVF= Dioscorea virus F (accession GenBank no. KU659021); ASPT= *Apple stem pitting virus* (JF946772); ApLV= *Apricot latent virus* (NC 014821); AGCaV= *Apple green crinkle associated virus* (NC 018714); PCMV= *Peach*

chlorotic mottle virus (NC 009892); GRSPaV= *Grapevine rupestris stem pitting-associated virus* (NC 001948); APV1= *Asian prunus virus 1* (NC 025388); PopMV= *Poplar mosaic virus* (NC 005343); LSV= *Lily symptomless virus* (AJ564638); NeLV= *Nerine latent virus* (JQ395044); AHLV= *American hop latent virus* (NC 017859); PVX= *Potato virus X* (NC 011620); CTLaV= *Cherry twisted leaf associated virus* (NC 024449)

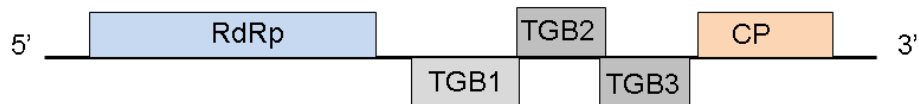


Fig. 2 Schematic representation of genomic organization of Dioscorea virus F (DVF). RdRp= RNA-dependent RNA polymerase (ORF 1); TGB 1= Triple Gene Block 1(ORF 2); TGB 2= Triple Gene Block 2 (ORF 3); TGB 3= Triple Gene Block 3 (ORF 4); CP= Coat Protein (ORF 5).

Table 1 Samples analyzed in this study and respective region of origin and the result of the detection.

Sample	Locality (County - State)	Detection
A1.1	Goiana - PE	Negative
A1.2	Goiana - PE	Negative
A1.3	Itapissuna - PE	Negative
A1.4	Itapissuna - PE	Positive
A1.5	Conde - PB	Positive
A1.6	Alhandra - PB	Negative
A1.7	Abreu e Lima - PE	Positive
A1.8	Núcleo Rural Vargem Bonita - DF	Positive
A1.9	Núcleo Bandeirantes - DF	Negative
A1.10	Goiana - PE	Negative
A1.11	Goiana - PE	Negative
A1.12	Goiana - PE	Negative
A1.13	Goiana - PE	Negative
A2.1	Bonito - PE	Negative
A2.2	Bonito - PE	Positive
A2.3	Bonito - PE	Positive
A2.4	Bonito - PE	Positive
A2.5	Bonito - PE	Positive
A2.6	Bonito - PE	Positive
A2.7	Bonito - PE	Negative
A2.8	Bonito - PE	Positive
A2.9	Bonito - PE	Positive
A3.1	Ferreiro - PE	Positive
A3.2	Ferreiro - PE	Positive
A3.3	Ferreiro - PE	Positive
A3.4	Ferreiro - PE	Positive
A3.5	Ferreiro - PE	Positive
A3.6	Ferreiro - PE	Positive
A3.7	Ferreiro - PE	Positive
A3.8	Ferreiro - PE	Positive

CONCLUSÕES GERAIS



CONCLUSÕES GERAIS

1. Utilizando a tecnologia de sequenciamento de nova geração (Next-Generation Sequencing) foi possível realizar a detecção de três novas espécies virais, Dioscorea virus C (DVC), Dioscorea virus S (DVS) e Dioscorea virus F (DVF) infectando plantas de inhame;
2. Em todas as amostras analisadas por RT-PCR foi detectado a infecção viral mista com duas ou mais espécies na mesma amostra, podendo este ser um processo mais comum do que se imaginava.