



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



**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO  
EM FITOPATOLOGIA**

**Tese de Doutorado**

**Caracterização de um isolado de *Yam mild mosaic virus*  
(YMMV) obtido de *Dioscorea trifida*, sequenciamento do  
genoma e produção de antissoro policlonal**

**Francisco de Assis Câmara Rabelo Filho**

**RECIFE-PE**

**2013**

**FRANCISCO DE ASSIS CÂMARA RABELO FILHO**

**CARACTERIZAÇÃO DE UM ISOLADO DE *Yam mild mosaic virus* (YMMV)  
OBTIDO DE *Dioscorea trifida*, SEQUENCIAMENTO DO GENOMA E  
PRODUÇÃO DE ANTÍSSORO POLICLONAL**

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:**

**Prof. Dr. Gilvan Pio Ribeiro (UFRPE) – Orientador**

**Prof. Dr. Bergmann Moraes Ribeiro (UnB) – Coorientador**

**Prof. Dr. Tatsuya Nagata (UnB) – Coorientador**

**RECIFE-PE  
FEVEREIRO-2013**

Ficha Catalográfica

R115c Rabelo-Filho, Francisco de Assis Câmara  
Caracterização de um isolado de *Yam mild mosaic virus*  
(YMMV) obtido de *Dioscorea trifida*, sequenciamento do  
genoma e produção de antissoro policlonal / Francisco de  
Assis Câmara Rabelo Filho. -- Recife, 2013.  
73 f. : il.

Orientador (a): Gilvan Pio Ribeiro.  
Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Universidade  
Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Agronomia,  
Recife, 2013.

Referências.

1. Inhame 2. Vírus 3. Diagnose 4. Sequenciamento  
I. Ribeiro, Gilvan Pio, orientador II. Título

CDD 632

**CARACTERIZAÇÃO DE UM ISOLADO DE *Yam mild mosaic virus* (YMMV)  
OBTIDO DE *Dioscorea trifida*, SEQUENCIAMENTO DO GENOMA E  
PRODUÇÃO DE ANTISSORO POLICLONAL**

**FRANCISCO DE ASSIS CÂMARA RABELO FILHO**

Tese defendida e aprovada pela Banca Examinadora em: 28/02/2013

**ORIENTADOR:**

---

Prof. Dr. Gilvan Pio Ribeiro  
(UFRPE)

**EXAMINADORES:**

---

Prof. Dr. Tatsuya Nagata (UnB)

---

Prof. Dr. José Albérico de Araújo Lima (UFC)

---

Dra. Genira Pereira de Andrade (UFRPE)

---

Dr. Cícero Nicolini (PDJ/UnB)

**RECIFE-PE  
FEVEREIRO-2013**

**Dedico esta tese:**

**A Deus, senhor de toda a sabedoria, por ter me guiado em todos os momentos deste trabalho, não só com a tese, mas por toda a caminhada acadêmica;**

**Aos meus queridos avós: José Borges, Maria Nazaré, Elpídio Câmara, Francisca de Oliveira (*in memoriam*) pela atenção e amor dispensados;**

**Aos meus estimados pais, Francisco de Assis Câmara e Maria Susete Rabelo Câmara, por todo o apoio desde os meus primeiros passos escolares até hoje, sempre de forma sábia, mostrando-me os caminhos a serem escolhidos;**

**Aos meus queridos irmãos Yls, Elpídio e Yzy Câmara pelo incentivo e pela constante presença em minha vida.**

## AGRADECIMENTOS

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 Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), pela oportunidade de realizar meu curso de doutorado em Fitopatologia e à Universidade de Brasília (UnB), pela estrutura para realização dos experimentos de tese;

Ao Professor Tatsuya Nagata, pela orientação e ajuda oferecida no decorrer da tese, além dos conhecimentos transmitidos sabiamente e pacientemente;

Aos professores Bergmann Moraes Ribeiro e Renato de Oliveira Resende da UnB, pelas sugestões nos experimentos, pela correção dos artigos e pela orientação;

Ao meu orientador, professor Gilvan Pio Ribeiro e a Genira Pereira de Andrade, pela colaboração oferecida no decorrer da tese;

Aos membros da banca pelas valiosas sugestões em prol da melhoria deste trabalho;

Aos Professores de Fitopatologia da UFRPE, em especial, Sami, Sônia, Delson, Marcos e Péricles, pelos conhecimentos transmitidos de forma sábia no decorrer do curso;

Aos colegas e amigos do curso (Fitopatologia–UFRPE): Hailson, Leonardo, Nelson, Marília, Carine, Kamila, Liliane, Kátia, João Victor e Fred pelos bons momentos. Aos amigos Felipe Colares e Eduardo Moreira (Entomologia–UFRPE), pela amizade e momentos de ajuda. Aos colegas e amigos da UnB: Franciele, Karol, Fabrício, Athos, Mikail, Léo, Layssa, Ana Cláudia, Virgínia, Kelly, Adriana, Rayane, Fernanda, André e Roberto pela boa convivência;

Ao professor Albérsio, pela orientação na iniciação científica e pelo apoio no decorrer da minha vida acadêmica, além da contribuição nos meus conhecimentos sobre virologia vegetal;

À professora Antônia, pela orientação de mestrado, assim como pelos bons momentos;

Ao amigo Jean Herllington Araújo pelo exemplo de profissionalismo, além da grande amizade desde a graduação em Agronomia (UFC);

Aos meus amigos Cícero Nicolini e Daniel Araújo, pelas ajudas nos experimentos, correções dos artigos e momentos de descontração;

À grande amiga Karina Carvalho e a amiga Rejane pela amizade e momentos de ajuda;

Aos amigos Maruzanete Melo e Francisco Gonçalves pelo companheirismo;

Aos meus tios, Socorro e Granjeiro Moraes, pela valiosa presença em minha caminhada acadêmica;

A todos que contribuíram, de forma direta ou indireta, para a realização deste trabalho.

## SUMÁRIO

RESUMO GERAL .....	ix
GENERAL ABSTRACT .....	x
INTRODUÇÃO GERAL .....	1
1. A cultura do inhame .....	1
2. Doenças na cultura do inhame .....	4
3. Importância das viroses na cultura do inhame .....	5
4. Principais vírus que infetam plantas de <i>Dioscorea</i> spp. ....	5
5. Diagnose de doenças causadas por vírus .....	6
6. Produção de Antissoro policlonal .....	8
7. Critérios moleculares para classificação de espécies do gênero <i>Potyvirus</i> .....	9
8. Referências Bibliográficas .....	12
CAPÍTULO II - The complete genome sequence of a Brazilian isolate of <i>Yam mild mosaic virus</i> .....	23
Abstract .....	24
Resumo .....	24
Acknowledgments .....	28
References .....	28
CAPÍTULO III - Genetic similarity of <i>Yam mild mosaic virus</i> is more related to host than geographical factor .....	33
Abstract .....	34
Resumo .....	34
Introduction .....	35
Material and Methods .....	36
Isolate maintenance .....	36
Electron Microscopy .....	36
RT-PCR by 3'RACE .....	36
Cloning and Sequencing .....	36
Sequence analysis .....	37
Results and Discussion .....	37

Conclusions.....	38
Acknowledgements.....	39
References.....	40
CAPÍTULO IV Cloning and expression of capsid protein by <i>Escherichia coli</i> from a Brazilian isolate of <i>Yam mild mosaic</i> virus and polyclonal antibody production.....	47
ABSTRACT.....	47
RESUMO.....	48
1. Introduction .....	48
2. Materials and Methods .....	50
2.1 Acquisition and cloning of the YMMVcoat protein gene.....	50
2.2 Cloning the <i>cp</i> gene into the entry vector .....	51
2.3 Cloning of <i>cp</i> gene into the expression vector .....	51
2.4 Expression, purification and quantitation of recombinant proteins .....	51
2.5 Immunization of rabbits for antiserum production against recombinant protein.....	52
2.6 Dot-ELISA .....	52
2.7 IgG purification and antibody conjugation to enzyme alkaline phosphatase.....	52
2.8 DAS-ELISA using controls and leaf samples .....	53
3. Results .....	53
4. Discussion.....	54
5. References .....	55
CONCLUSÕES GERAIS .....	61



## RESUMO GERAL

O inhame (*Dioscorea* spp.) apresenta importante papel socioeconômico na região Nordeste do Brasil. Além de fornecer alimento de alto valor nutritivo para a dieta humana, é fonte de renda para famílias de baixo poder aquisitivo, empregando grande contingente de mão de obra. Dentre os problemas fitossanitários desta cultura, destacam-se as doenças fúngicas e aquelas causadas por nematoides. As viroses apresentam também elevada importância, principalmente por ocasionarem degenerescência de cultivares, com diminuição do vigor das plantas e, conseqüentemente perdas qualitativas e quantitativas da produção. Três vírus se destacam, em nível de Brasil, com registros nas principais cultivares empregadas no Nordeste, *Yam mosaic virus* (YMV) e *Yam mild mosaic virus* (YMMV), pertencentes ao gênero *Potyvirus*, família *Potyviridae* e um vírus do gênero *Badnavirus*, família *Caulimoviridae*. Recentemente, foram detectados mais dois vírus, pertencentes aos gêneros *Begomovirus* e *Curtovirus*, família *Geminiviridae*. No presente trabalho, inicialmente foram efetuadas a detecção e caracterização de um isolado de YMMV, obtido de *D. trifida*, por meio de análise eletromicroscópica, incluindo a visualização de inclusões citoplasmáticas típicas do gênero *Potyvirus*. Em seguida, foram realizados estudos moleculares com *primers* específicos para o YMMV em RT-PCR, seguido de RT-PCR com *primers* degenerados para vírus do gênero *Potyvirus*, clonagem do produto correspondente à capa proteica e análise filogenética, com os dados de sequências disponíveis no GenBank. Também foi realizado o sequenciamento do genoma completo de um isolado de YMMV e estudo detalhado da sequência de nucleotídeo, mediante amplificação do cDNA e clonagem em plasmídeos pGEM-T Easy e do pCR 4 Topo, cujos dados foram depositados no GenBank. A diagnose das fitoviroses pode ser efetuada por técnicas sorológicas e moleculares. Na cultura do inhame, usa-se, em geral, ferramentas moleculares, pela dificuldade na aquisição de antissoros específicos, o que encarece a identificação dos agentes virais. Antissoro policlonal para YMMV foi desenvolvido em coelho usando a proteína capsidial de um isolado do vírus expressa *in vitro* no sistema *Escherichia coli*.

**Palavras-chaves:** *Potyvirus*, inhame, clonagem, diagnose.

## GENERAL ABSTRACT

The yam (*Dioscorea* spp.) has an important economic and social role in the Northeast of Brazil, providing food with high value to the human diet. It is also a source of income to poor family, employing large number of manpower. Among the phytosanitary problems of this crop, the fungal and nematode diseases are the most important ones. The virus diseases also have high importance, especially for causing cultivar degeneracy, with reduction of plant vigor and consequent qualitative and quantitative production losses. Three viruses stand out in Brazil with occurrence on main cultivars used in Northeast, *Yam mosaic virus* (YMV) and *Yam mild mosaic virus* (YMMV), belonging to the genus *Potyvirus*, family *Potyviridae* and one virus of the genus *Badnavirus*, family *Caulimoviridae*. Recently, two more viruses from the genus *Begomovirus* and *Curtovirus* genus, family *Geminiviridae* were detected. In the present work, initially, the detection and characterization of an YMMV isolate obtained from *D. trifida* were undertaken by electronic microscope analysis including visualization of cytoplasmatic inclusions typical of the genus *Potyvirus*. In addition, molecular studies with specific primers for YMMV in RT-PCR, followed by RT-PCR with degenerate primers to viruses of the *Potyvirus* genus, cloning the product corresponding to the coat protein and phylogenetic analysis including sequences available at the GenBank were done. Sequencing of the complete genome of a YMMV isolate and a detailed study on the nucleotide sequence of this virus by cDNA amplification and cloning in plasmids pGEM-T Easy and the pCR 4 Topo were also realized, and the data deposited in GenBank. The diagnosis of plant virus diseases can be realized by serological and molecular techniques. In yam crop, molecular tools normally are used due to difficulties in acquiring specific antisera, making more expensive the identification of viral agents. Polyclonal antiserum was produced in rabbit for YMMV, using the coat protein of an isolate of YMMV expressed *in vitro* using *Escherichia coli* system.

**Keywords:** *Potyvirus*, yam, cloning, diagnosis.

## **CAPÍTULO I**



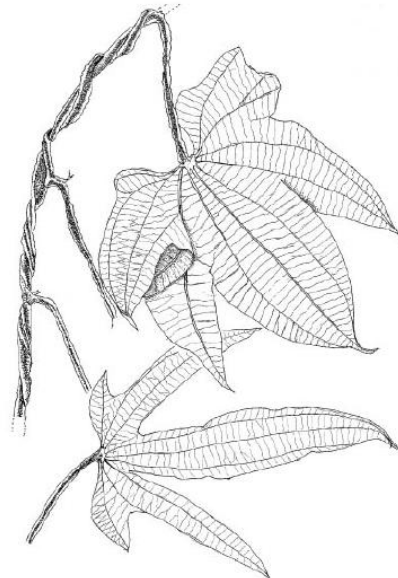
### **Introdução Geral**

# CARACTERIZAÇÃO DE UM ISOLADO DE *Yam mild mosaic virus* (YMMV) OBTIDO DE *Dioscorea trifida*, SEQUENCIAMENTO DO GENOMA E PRODUÇÃO DE ANTISSORO POLICLONAL

## INTRODUÇÃO GERAL

### 1. A cultura do inhame

O inhame (*Dioscorea* spp.) compreende cerca de 600 espécies pertencentes à família Dioscoreaceae, das quais somente algumas são cultivadas por produzirem túberas comestíveis, destacando-se *D. esculenta* (Lour.) Burkill, *D. cayennensis* Lam., *D. alata* L., *D. rotundata* Poir. (KASASIAN, 1978; MONTEIRO; PERESSIN, 2002). As três últimas espécies estão entre as mais cultivadas no Brasil (SANTOS et al., 2007b) e *D. cayennensis* e *D. alata* as mais comercializadas para fins de alimentação humana (OLIVEIRA; MOURA; MAIA, 2005). Além destas espécies, *D. trifida* L. (Figura 1), cuja provável origem é a região da Guiana (América do Sul), é cultivada no Norte da América do Sul e Ilhas do Caribe (KAY; GOODING, 1987) e, atualmente, é plantada no Nordeste brasileiro em pequena escala.



**FIGURA 1.** Esquema ilustrativo de uma planta de *Dioscorea trifida*, mostrando a porção vegetativa superior, com ênfase ao formato das folhas (LEBOT, 2009).

O inhame, juntamente com outras culturas que produzem raízes e tubérculos, a exemplo da mandioca (*Manihot esculenta* Crantz), batata-doce [*Ipomoea batatas* (L.) Lam.] e batata (*Solanum tuberosum* L.) são consideradas muito importantes principalmente nos trópicos úmidos e subúmidos onde não se obtém grande produção de cereais (DIOP; CALVERLEY, 1998). É uma cultura que se desenvolve bem em áreas de precipitação pluviométrica com índices anuais variando de 1.000 a 1.600 milímetros e com gradiente térmico entre 24 a 39 °C, com umidade relativa do ar variando de 60 a 70% (SANTOS et al., 2007a). A cultura do inhame produz bem em solos de textura arenosa e média, suficientemente profundos, bem drenados e arejados, férteis e ricos em matérias orgânicas, permitindo assim um melhor desenvolvimento das túberas e, conseqüentemente maior produção (SANTOS, 1996; SANTOS, 2002; SANTOS et al., 2006).

A produção mundial de inhame no ano agrícola de 2011 foi de aproximadamente 56.613.722 t distribuídas por volta de 4.882.306 ha. Destas, o continente africano é responsável por 96% da produção e 95,4% da área plantada (FAO, 2011). O maior produtor mundial é a Nigéria com uma produção de 37.115.500 t distribuídas em 2.889.050 ha, o que dá uma média de 12,84 t/ha. Apesar de ser o maior produtor mundial, a produtividade na Nigéria está muito aquém de países, como o Japão que consegue mais de 23,76 t/ha (FAO, 2011), muito provavelmente, em função do nível tecnológico utilizado naquele país.

Embora o Brasil não esteja inserido entre os maiores produtores mundiais de inhame, apresentou uma produção, em 2011, de 244.142 t, distribuída em 25.035 ha, sendo superado apenas pela Colômbia, quando comparado a outros países da América do Sul. A Colômbia possui uma produção de 346.986 t, em uma área de 33.426 ha, atingindo uma produtividade de aproximadamente 10,38 t/ha e 9,75 t/ha, respectivamente, para a Colômbia e o Brasil (FAO, 2011).

Nos campos de produção localizados na região Nordeste do Brasil, predomina o cultivo do complexo *D. cayennensis* – *D. rotundata* (ANDRADE, 2007), com a cultivar conhecida como Cará-da-Costa, Cará-Inhame ou Inhame-da-Costa, considerada como um dos principais alimentos em regiões tropicais (MAFRA, 1996). O Cará São Tomé, da espécie *D. alata*, é também bastante cultivado nessa região, sendo conhecido como Inhame ou Cará São Thomé.

O plantio do inhame é justificado pelo alto valor econômico das túberas, além de ser um alimento muito aceito pela população (MOURA, 2005), alcançando no Nordeste, especialmente nos maiores estados produtores, como Paraíba, Pernambuco e Bahia, uma

produção satisfatória por apresentar ambiente favorável ao seu cultivo. Além disso, destaca-se a grande importância socioeconômica, uma vez que é uma hortaliça produtora de túberas, com alto valor energético e nutritivo (CIACCO; D'APPOLONIA, 1978; SANTOS, 1996; SANTOS et al., 2007a) sendo rica em carboidratos, especialmente o amido, vitaminas do complexo B (tiamina, riboflavina, niacina, adermanina), além de possuírem baixos teores de gorduras (SANTOS et al., 2007a). Segundo Mafra (1978), alguns parâmetros podem ser variáveis de acordo com a cultivar, a exemplo da quantidade de amido, proteínas, bem como a umidade.

Dentre os estados brasileiros produtores desta amilácea, Pernambuco tem apresentado uma boa representatividade, onde o cultivo é praticado principalmente por pequenos produtores que a utilizam para consumo direto. A maioria dos plantios constitui uma atividade agrícola tipicamente familiar que gera renda e trabalho, empregando, em média, 1,25 homens por hectare ao ano (SANTOS, 2002). Além dos empregos diretos, a cadeia produtiva do inhame envolve outros setores como: armazenamento, transporte e comercialização, demonstrando que a cultura apresenta grande importância econômica e social para o desenvolvimento da região Nordeste (OLIVEIRA et al., 2007). Paraíba e Pernambuco apresentam as maiores produções com 56.341 e 49.500 t, respectivamente (SANTOS; MACÊDO, 2002).

No Estado de Pernambuco, as principais áreas cultivadas com inhame encontram-se na mesorregião da Zona da Mata, em especial nos municípios de Igarassu, Goiana, Condado e Aliança, da Zona da Mata Norte, e nos municípios de Amaraji e Bonito da Zona da Mata Sul (PAULA, 2000). O destino da produção de inhame está em função da qualidade do produto e da época do ano, podendo abastecer vários estados do Nordeste, assim como outras regiões, ou ainda, ser exportado (ANDRADE, 2007). Segundo dados da CEASA-PE (Centro de Abastecimento e Logística de Pernambuco), o inhame comercializado atualmente neste centro de entreposto comercial é oriundo de três estados: Paraíba, Pernambuco e Bahia (CEASA-PE, 2012).

Várias são as causas de perdas e reduções de produtividade da cultura, incluindo os fatores bióticos e abióticos. Levando em consideração os fatores de natureza biótica, as doenças e insetos-praga apresentam elevada importância (RITZINGER et al., 2003).

## 2. Doenças na cultura do inhame

Os problemas fitossanitários do inhame são importantes, em função da diminuição da produtividade e perdas observadas no transporte e armazenamento, com conseqüente depreciação do produto para os mercados interno e externo (MOURA, 2005). Diversas doenças causadas por fungos, nematoides e vírus têm sido relatadas nessa cultura, cujos efeitos deletérios são influenciados pelos fatores ambientais. Segundo revisão feita por Amusa et al. (2003), a respeito das doenças do inhame na Nigéria, maior produtor mundial, a antracnose é a mais difundida no campo, enquanto que o mosaico causado por *Yam mosaic virus* (YMV) é a que causa as maiores perdas e a podridão seca é a mais devastadora entre todas as doenças de armazenamento. Além de *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc., *Rhizoctonia solani* J.G. Kühn, *Pestalotia* De Not. sp. e *Curvularia* Boedijn sp. ocorrem na forma de um complexo em *D. alata*, *D. rotundata* e *D. cayennensis* naquele país. Em Ghana, Asare-Bediako; Showemimo e Opoku-Asiama (2007) verificaram a ocorrência de *Cladosporium* Link sp., *Fusarium* Link sp., *Penicillium* Link sp., *Trichoderma* Pers. sp., *Corynebacterium* Lehmann & Neumann sp., espécies de *Aspergillus* P. Micheli sp., *Sclerotium rolfsii* Sacc. e *Rhizopus stolonifer* (Ehrenb.) Vuill, associado a cultura.

O ataque de nematoides constitui um sério problema para a cultura, podendo reduzir a produção em até 90% (SANTOS et al., 2009). O inhame é hospedeiro de pelo menos cinco espécies de nematoides. Moura, Oliveira e Torres (2005), realizando levantamento das principais espécies de nematoides presentes no inhame em seis municípios pernambucanos, observaram a ocorrência de *Meloidogyne* Göldi, spp., *Rotylenchulus reniformis* Linford & Oliveira, *Criconemella ornata* De Grisse & Loof, *Pratylenchus coffeae* (Zimmermann) Filipjev & Stekhoven e *Helicotylenchus dihystera* (Cobb) Sher. A não observação da presença de *Scutellonema bradys* Steiner & LeHew nesse trabalho, espécie amplamente registrada nessa região, indica possível substituição deste nematoide por *P. coffeae*, ambos considerados agentes causais da casca-preta-do-inhame (MOURA, 2005). No Nordeste, as nematoses meloidoginose e a casca-preta causam elevados danos à cultura, ocasionados pela alta incidência e severidade (SANTOS et al., 2009). A espécie *D. trifida* normalmente não apresenta problemas de insetos-praga e doenças, porém problemas graves podem ocorrer ocasionalmente. Infestação de nematoides pode causar danos à raiz, a qual é ocasionada por *M. incognita* e *P. coffeae* (KAY; GOODING, 1987).

Apesar de existir relatos de bactérias causando doenças no inhame em outros países produtores (AMUSA et al., 2003; ASARE-BEDIAKO; SHOWEMIMO; OPOKU-ASIAMA, 2007), no Brasil ainda não foi registrada bacteriose de importância econômica nessa cultura (OLIVEIRA; MOURA; MAIA, 2005).

### **3. Importância das viroses na cultura do inhame**

As doenças causadas por vírus apresentam elevada importância, podendo reduzir a produção e interferir em aspectos qualitativos. Nas culturas propagadas vegetativamente, a exemplos do inhame (BRUNT; JACKSON; FRISON, 1989; KENYON et al., 2001) e da batata (COSTA, 1965; HOOKER, 1981), têm merecido destaque, por não apresentarem medidas de controle curativas e, principalmente, pelo fato das plantas serem propagadas vegetativamente, perpetuando as espécies virais de uma para outra geração. Nesses casos ocorre o fenômeno da degenerescência de cultivares após multiplicações sucessivas no campo. Como não existem tratamentos curativos para os fitovírus, os métodos de controle empregados apenas minimizam o risco de infecções e perdas (HULL, 2002). Esta situação ocorre no inhame, onde normalmente, o produtor não possui uma estrutura que garanta uma boa qualidade fitossanitária do material propagativo, favorecendo a infecção generalizada, principalmente por vírus propagados para gerações posteriores pelo uso de túbera-sementes infectadas.

### **4. Principais vírus que infetam plantas de *Dioscorea* spp.**

Em nível mundial, foram descritos na cultura do inhame vírus pertencentes aos gêneros: *Potyvirus*, *Badnavirus*, *Cucumovirus*, *Potexvirus*, *Begomovirus* e *Curtovirus* (ANDRADE, 2007; ANDRADE et al., 2006; ASALA et al., 2012; KENYON et al., 2001; LIMA, 2012; MUMFORD; SEAL, 1997; ODU et al., 2006; QUEIROZ et al., 2009). Merece destaque, pela importância e distribuição geográfica, os membros dos gêneros *Potyvirus* e *Badnavirus*, ocorrendo em infecções simples e mistas (ANDRADE, 2007; ASALA et al., 2012; KENYON et al., 2001; MUMFORD; SEAL, 1997; PIO-RIBEIRO et al., 2006; QUEIROZ et al., 2009). A ocorrência de infecções, com mais de um vírus na mesma planta, em condições de campo, normalmente aumenta a intensidade da doença, o que pode influenciar negativamente na cultura, refletindo na produção. Em *D. trifida*, os sintomas de



viroses podem aparecer como um mosaico de folhas, nanismo e distorção da planta, provocando redução ou perda de tubérculos (KAY; GOODING, 1987).

Até o ano de 1982, não havia relato de vírus na cultura do inhame no Brasil (ÁVILA; GAMA; KITAJIMA, 1982), quando houve a detecção de um potyvírus, mediante utilização da microscopia eletrônica. Estudos complementares, mediante a caracterização biológica, com uso de gama de hospedeiros não forneceram resultados conclusivos, sobre a identificação específica do vírus responsável pelo mosaico em folhas de inhame, motivado pelo insucesso na transmissão mecânica para espécies experimentais, e na purificação viral devido à alta viscosidade e rápida oxidação das folhas de inhame.

Atualmente, sabe-se que ocorrem no Brasil pelo menos duas espécies importantes do gênero *Potyvirus*: *Yam mosaic virus* (YMV) e o *Yam mild mosaic virus* (YMMV) (ANDRADE, 2007; ANDRADE et al., 2006; PIO-RIBEIRO et al., 2006; QUEIROZ et al., 2009; RABELO-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*. O YMMV foi relatado nas duas espécies do complexo, em Pernambuco e na Paraíba, ocorrendo de forma isolada ou em associação a outras espécies virais. Além dos potyvírus, também foram detectados no Nordeste Brasileiro, vírus pertencentes aos gêneros *Badnavirus* (ANDRADE, 2007; PIO-RIBEIRO et al., 2006), *Begomovirus* e *Curtovirus* (LIMA, 2012).

## 5. Diagnóstico de doenças causadas por vírus

A identificação correta do agente viral causador de doença, o que normalmente necessita do uso de técnicas moleculares e/ou sorológicas, é de grande importância para se chegar ao estabelecimento das medidas de controle. Embora a sorologia forneça boa precisão na identificação de vírus, para realizar a técnica *Enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA), é necessário um antissoro específico para o patógeno, o que nem sempre é disponível, em razão da dificuldade de se conseguir a purificação adequada de alguns vírus a partir de plantas hospedeiras que possuem compostos inibitórios (fenólicos, oxidantes, etc.), o que dificultam a purificação viral. Para que o vírus purificado possa ser utilizado na produção de antissoro, com qualidade desejável, as plantas hospedeiras devem apresentar uma alta concentração viral e permitir obtenção de preparações livres de componentes antigênicos celulares. Para a diagnose em larga escala, a técnica ELISA é bastante empregada pela sua

sensibilidade, reprodutibilidade e uso simultâneo de um grande número de amostras (LIMA et al., 2012).

Nem todos os vírus de plantas apresentam uma rápida replicação nas células de seus hospedeiros e alguns ocorrem em baixas concentrações, dificultando a sua purificação. Em hospedeiros, como o alho (*Alium sativum* L.), em que ocorrem comumente infecções mistas, a purificação biológica das espécies virais é dificultada pela semelhança na sintomatologia e gama de hospedeiros, dificultando, dessa forma, a obtenção de antissoros específicos. Como alternativa para superar essas dificuldades, proteínas desses vírus, podem ser expressas no sistema eucariótico e utilizadas na produção de antissoros (ALVES-JÚNIOR et al., 2008).

A diagnose rápida e precisa das doenças de inhame é importante para o estabelecimento de estratégias de controle. Testes com gama de hospedeiro, transmissão por afídeos vetores, além de serem demorados, tem sua eficiência questionada para os vírus da cultura do inhame (ANDRADE, 2007; ÁVILA; GAMA; KITAJIMA, 1982). A dificuldade na obtenção de antissoros de qualidade (RABELO-FILHO et al., 2005), constitui fator limitante para o uso das técnicas sorológicas na diagnose de viroses vegetais. Uma alternativa para esta situação pode advir do uso de informações moleculares. Dados disponibilizados no GenBank têm sido usados, com frequência, para elaboração de *primers*, em conformidade com uma região específica do genoma viral, baseando-se na taxonomia do gênero em estudo ou até mesmo em nível de espécie. Tal estratégia tem sido usada para diagnose e/ou estudos de doenças do inhame (BOUSALEM et al., 2003; FUJI et al., 1999; MUMFORD; SEAL, 1997; RABELO-FILHO et al., 2013).

Por conta de fatores que limitam e/ou reduzem a qualidade dos antissoros produzidos pelos métodos tradicionais para determinados vírus de plantas, a imunização de animais tem sido efetuada com proteínas capsidiais produzidas em sistema de expressão *in vitro*. Para tanto, procede-se a clonagem e expressão do gene da capa proteica por meio de sistemas de expressão eucarióticos ou procarióticos e o produto da expressão é empregado na imunização de animais, obtendo-se antissoro isento de reações não específicas.

## 6. Produção de Antissoro policlonal

Antissoros policlonais são muito usados na detecção, identificação e estudo dos mais diferentes patógenos, sejam eles: fungos (MUNIZ et al., 2012), bactérias (ARAÚJO et al., 2005), vírus (ASALA et al., 2012; CEROVSKA et al., 2012; ENI; HUGHES; REY, 2010b; LIMA et al., 2012; LIMA; LIMA; GONÇALVES, 2001) e nematoides (DAVIES; DANKS, 1992). Na virologia vegetal, o uso de antissoro tornou-se uma boa ferramenta de diagnose de viroses para detecção e identificação de vírus e indexação de materiais vegetais, podendo ser usado com eficiência em elevados números de amostras. Na produção de antissoros policlonais, normalmente, usa-se planta hospedeira para multiplicação viral objetivando a purificação do vírus. Na literatura, existem inúmeros trabalhos que tratam do uso de hospedeiras vegetais para esses fins, sendo o antissoro obtido de animal imunizado com preparações virais purificadas (LIMA et al., 2012). Porém, nem sempre isso é possível por fatores inerentes ao hospedeiro e aos vírus. Na ausência de meios para realização de purificação físicoquímica, tem-se usado a expressão de proteínas virais com alta imunogenicidade, expressando-a em um sistema de expressão eucariótico (leveduras, baculovírus) ou procariótico (bactérias).

No caso do inhame, por exemplo, os potyvírus e badnavírus que o infectam, normalmente não são facilmente transmissíveis para hospedeiros que permitam a purificação (ANDRADE, 2007; ÁVILA; GAMA; KITAJIMA, 1982; ENI; HUGHES; REY, 2010a). Portanto, são usadas alternativas para a produção de antissoros contra esses vírus, como bactérias ou baculovírus para expressar regiões do genoma do vírus que tenham boa imunogenicidade. A capa proteica tem sido muito usada por ser uma região com boa propriedade imunogênica (BARBIERI et al., 2004).

Muitos trabalhos usam procariotos como sistema de expressão gênica pela facilidade de obtenção da proteína-alvo e pelo baixo custo do sistema, quando comparado a outros sistemas. Normalmente, usa-se o gene da capa proteica dos vírus para a realização da expressão de proteínas. Segundo Barbieri et al. (2004), a proteína capsidial em muitos vírus é a única com propriedades imunogênicas e um antissoro produzido a partir da proteína livre apresentará as mesmas propriedades daqueles produzidos a partir de partículas virais purificadas. Porém, existem trabalhos na literatura, em que outros genes são usados na expressão de proteínas para fins de diagnose. Calegario et al. (2012), ao estudar o vírus da leprose dos citros, *Citrus leprosis virus C* – (CiLV-C), procuraram expressar a proteína de

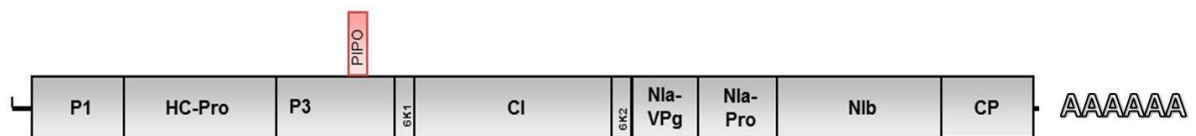
movimento para a obtenção do antissoro. Vários são os trabalhos na literatura que citam o uso da expressão de proteínas mediante uso de bactérias como vetor de expressão gênica (ABDELKADER et al., 2004; GULATI-SAKHUJA et al., 2009; RADAELLI et al., 2008; SEQUEIRA; NOLASCO, 2002; SINGH et al., 2011; SMITH et al., 1998). Radaelli et al. (2008) utilizaram *Escherichia coli* na expressão da proteína capsial de *Grapevine leafroll-associated virus 2* (GLRaV-2) e *Grapevine virus B* (GVB) que infectam a cultura da videira (*Vitis* spp.) visando a produção de antissoro para ser usado com fins de diagnose. Barbieri et al. (2004) também fizeram uso deste sistema de expressão a fim de obter antissoro específico para o *Watermelon mosaic virus* (WMV), com ausência de reações em plantas saudáveis e com outras espécies de *Potyvirus* que também causam infecção em cucurbitáceas. Embora vários animais possam ser usados na produção de anticorpos policlonais, os coelhos são mais usados por serem animais dóceis e de fácil manuseio, permitindo retirar quantidade suficiente de sangue para usar na diagnose de vírus de plantas, os antissoros produzidos, podem ser usados nas mais diversas variações do teste ELISA, sendo a imunoglobulina G (IgG), presente no sangue animal, a imunoglobulina usada no reconhecimento anticorpo-antígeno, via teste ELISA (ALMEIDA; LIMA, 2001; LIMA et al., 2012).

Lima e Nascimento (2012) desenvolveram um kit PTA-ELISA para identificação de seis espécies virais dos gêneros *Comovirus* - *Squash mosaic virus* (SqMV) e *Cowpea severe mosaic virus* (CPSMV), *Cucumovirus* - *Cucumber mosaic virus* (CMV), *Potyvirus* - *Cowpea aphid-borne mosaic virus* (CABMV) e *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV) e *Sobemovirus* - *Papaya lethal yellowing virus* (PLYV), podendo ser usado na indexação destas espécies virais.

## **7. Critérios moleculares para classificação de espécies do gênero *Potyvirus***

Para a classificação de vírus são empregados os critérios do *International Committee on Taxonomy of Viruses* (ICTV), através da análise das características do vírus e da sua interação com o hospedeiro. Segundo King et al. (2012), os critérios moleculares para a distinção de espécies da família *Potyviridae* são a sequência da capa proteica e do genoma inteiro, sendo necessário identidade inferior a 80% para aminoácidos e 76% para nucleotídeos, e diferenças nos sítios de clivagens da poliproteína.

Os membros deste gênero apresentam o genoma constituído por uma grande Unidade de Leitura Aberta, *Open Reading Frame* (ORF) que codifica 10 proteínas: P<sub>1</sub>, HC-PRO, P<sub>3</sub>, 6K<sub>1</sub>, CI, 6K<sub>2</sub>, NIa-VPg, NIa-Pro, NIb e CP, com funções variadas (MURPHY et al., 1995) (Figura 2, Tabela 1). Recentemente foi descoberta a ORF PIPO (*Pretty Interesting Potyviridae* ORF) mediante um alinhamento múltiplo de 48 espécies virais da família *Potyviridae* realizado por Chung et al. (2008) e a verificação de uma sobreposição em parte do gene P<sub>3</sub>. A PIPO está relacionada ao movimento do vírus na planta (WEI et al., 2010.; WEN; HAJIMORAD, 2010).



**FIGURA 2.** Esquema representativo típico do genoma de vírus do gênero *Potyvirus*, indicando as proteínas codificadas, juntamente com a cauda de Poli A, no final da molécula, acrescido da PIPO (em destaque na cor) (Adaptado de RABELO-FILHO et al., 2013).

**TABELA -1.** Propriedades e funções de proteínas codificadas pelos potyvírus.

<b>Proteína</b>	<b>Peso molecular</b>	<b>Funções</b>
P1	32–64 KDa	Proteinase serina semelhante à tripsina, de autoclivagem da extremidade C-terminal; sintomatologia; movimento célula a célula.
HC-Pro	56–58 KDa	Transmissão por afídeos; autointeração; movimento sistêmico; sinergismo e desenvolvimento dos sintomas; supressão do silenciamento gênico; proteinase de cisteína semelhante à papaína de autoclivagem da região C-terminal.
P3	37 KDa	Patogenicidade; replicação.
6K1		Não elucidada.
CI	70 KDa	ATPase/RNA helicase; movimento célula a célula.
6K2		Ancoramento do complexo de replicação viral na membrana.
VPg		Replicação do genoma; especificidade do genótipo hospedeiro.
NIa- Pro	49 KDa	Localização celular; Proteinase serina semelhante à tripsina, atuando em <i>Cis</i> e <i>Trans</i> ; interação proteína-proteína.
NIb	58 KDa	RNA polimerase dependente de RNA; envolvida na replicação do genoma.
CP	28–40 KDa	Transmissão por afídeos; movimentos sistêmicos e de célula a célula; montagem da partícula viral; replicação viral.
PIPO*		Movimento viral

Adaptado de: Fonseca (2003) e Urcuqui-Inchima; Haenni e Bernardi (2001).

\*Wen e Hajimorad (2010); Wei et al. (2010).

Os objetivos do presente trabalho foram: 1) realizar a detecção e caracterização de um isolado de YMMV obtido de *D. trifida*, incluindo uma análise filogenética, conjuntamente com os dados de sequências disponíveis no GenBank; 2) sequenciamento do genoma completo de um isolado do vírus, mediante amplificação do cDNA e a clonagem em plasmídeos pGEM-T Easy e do pCR4 Topo; e, 3) produção de antissoro policlonal específico para YMMV em coelho, usando-se a proteína capsial expressa em *E. coli*.

## 8. Referências Bibliográficas

ABDELKADER, H. S.; ABDEL-SALAM, A. M.; EL SAGHIR, S. M.; HUSSEIN, M. H. Molecular cloning and expression of recombinant coat protein gene of *Banana bunchy top virus* in *E. coli* and its use in the production of diagnostic antibodies. **Arab Journal of Biotechnology**, Giza, v. 7, n. 2, p. 173-188, 2004.

ALMEIDA, A. M. R.; LIMA, J. A. A. Técnicas sorológicas aplicadas à fitovirologia In: ALMEIDA, A. M. R.; LIMA, J. A. A. (Eds). **Princípios e técnicas de diagnose aplicados em fitovirologia**. Brasília: Sociedade Brasileira de Fitopatologia; Brasília, 2001. cap. 3, p. 33-62.

ALVES-JÚNIOR, M.; MARRACHINI, F. M.; MELO-FILHO, P. A.; DUSI, A. N.; PIO-RIBEIRO, G.; RIBEIRO, B. M. Recombinant expression of *Garlic virus C* (GARV-C) capsid protein in insect cells and its potential for the production of specific antibodies. **Microbiological Research**, Jena, v. 163, n. 3, p. 354-361, 2008.

AMUSA, N. A.; ADEGBITE, A. A.; MUHAMMED, S.; BAIYEWU, R. A. Yam diseases and its management in Nigeria. **African Journal of Biotechnology**, Nairobi, v. 2, n. 12, p. 497-502, 2003.

ANDRADE, G. P. **Diagnóstico fitossanitário da cultura do inhame (*Dioscorea spp.*) em áreas produtoras do Nordeste do Brasil**. 2007. 75 f. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife.

ANDRADE, G. P.; SILVA, A. K. S.; FILLOUX, D.; PIO-RIBEIRO, G.; KITAJIMA, E. W.; XAVIER, D. M.; NASCIMENTO, R. J. Ocorrência de YMMV em *Dioscorea alata* no Estado de Pernambuco. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, 39., 2006. Salvador. **Anais...** Brasília: Sociedade Brasileira de Fitopatologia, 2006, v. 31, p. S344-S344.

ARAÚJO, J. S. P.; REIS-JÚNIOR, F. B. R.; CRUZ, G. B.; OLIVEIRA, B. C.; ROBBS, C. F.; RIBEIRO, R. L. D.; POLIDORO, J. C. Produção e caracterização de anticorpos policlonais contra *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 40, n. 3, p. 305-309, 2005.

ASALA, S.; ALEGBEJO, M. D.; KASHINA, B.; BANWO, O. O.; ASIEDU, R.; LAVA-KUMAR, P. Distribution and incidence of viruses infecting yam (*Dioscorea* spp.) in Nigeria. **Global Journal of Bio-Science & Biotechnology**, Lucknow, v. 1, n. 2, p. 163-167, 2012.

ASARE-BEDIAKO, E.; SHOWEMIMO, F. A.; OPOKU-ASIAMA, Y. Microorganisms associated with rot of minisetts of white yam (*Dioscorea rotundata* Poir). **Research Journal of Microbiology**, Rosemead, v. 2, n. 3, p. 278-283, 2007.

ÁVILA, A. C.; GAMA, M. I. C. S.; KITAJIMA, E. W. Detecção de um *Potyvirus* em inhame (*Dioscorea* spp.) no Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 7, n. 3, p. 447-452, 1982.

BARBIERI, M. R.; CARVALHO, M. G.; ZAMBOLIM, E. M.; ZERBINI, F. M. Expressão em *Escherichia coli* da proteína capsidial do *Watermelon mosaic virus* e produção de anti-soro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 29, n. 2, p. 215-219, 2004.

BOUSALEM, M.; DALLOT, S.; FUJI, S.; NATSUAKI, K. T. Origin, world-wide dispersion, bio-geographical diversification, radiation and recombination: an evolutionary history of *Yam mild mosaic virus* (YMMV). **Infection, Genetics and Evolution**, Amsterdam, v. 3, n. 3, p. 189-206, 2003.

BRUNT, A. A.; JACKSON, G. V. H.; FRISON, E. A. **FAO/IBPGR technical guidelines for the safe movement of yam germplasm**. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations; International Board for Plant Genetic Resources. 1989, 20 p.

CALEGARIO, R. F.; LABATE, M. T. V.; PERONI, L. A.; STACH-MACHADO, D. R.; ANDRADE, M. O.; FREITAS-ASTÚA, J.; LABATE, C. A.; MACHADO, M. A.; KITAJIMA, E. W. *In vitro* expression and antiserum production against the movement



protein of *Citrus leprosis virus C* (CiLV-C). **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v. 37, n. 2, p. 136-141, 2012.

CEASA-PE (Centro de Abastecimento e Logística de Pernambuco). **Principais municípios fornecedores**. Recife: Centro de Abastecimento e Logística de Pernambuco, 2012. Disponível em:

<[http://www.ceasape.org.br/calendario\\_pdf/PRINCIPAIS\\_MUNICIPIOS\\_FORNECEDORE\\_S\\_2012.pdf](http://www.ceasape.org.br/calendario_pdf/PRINCIPAIS_MUNICIPIOS_FORNECEDORE_S_2012.pdf)>. Acesso em: 22 jan. 2013.

CEROVSKA, N.; MORAVEC, T.; PLCHOVA, H.; HOFFMEISTEROVA, H.; DEDIC, P. Production of polyclonal antibodies to the recombinant *Potato virus M* (PVM) non-structural triple gene block protein 1 and coat protein. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 160, n. 5, p. 251-254, 2012.

CHUNG, B. Y.-W.; MILLER, W. A.; ATKINS, J. F.; FIRTH, A. E. An overlapping essential gene in the Potyviridae. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 105, n. 15, p. 5897-5902, 2008.

CIACCO, C. F.; D'APPOLONIA, B. L. Baking studies with cassava and yam flour. I. Biochemical composition of cassava and yam flour. **Cereal Chemistry**, Saint Paul, v. 55, n. 3, p. 402-411, 1978.

COSTA, A. S. Moléstias de vírus da batata. **Boletim do Campo**, Rio de Janeiro, v. 21, n. 190, p. 68-83, 1965.

DAVIES, K. G.; DANKS, C. Interspecific differences in the nematode surface coat between *Meloidogyne incognita* and *M. arenaria* related to the adhesion of the bacterium *Pasteuria penetrans*. **Parasitology**, Cambridge, v. 105, n. 3, p. 475-480, 1992.

DIOP, A.; CALVERLEY, D. J. B. **Storage and processing of roots and tubers in tropics**. Rome: Food and Agricultural Organization of United Nations; Agro-Industries and Postharvest Management Service Agro Supports System Division. 1998. Disponível em: <<http://www.fao.org/docrep/X5415E/x5415e00.htm#Contents>>. Acesso em: 03 jan. 2013.

ENI, A. O.; HUGHES, J. d' A.; REY, M. E. C. Production of polyclonal antibody against an isolate of Yam-infecting *Badnavirus* from Nigeria. **Australian Journal of Basic and Applied Sciences**, Punjab, v. 6, n. 5, p. 4158-4163, 2010a.

ENI, A. O.; HUGHES, J. d' A.; REY, M. E. C. Production of polyclonal antibodies against a Yam isolate of *Cucumber mosaic virus* (CMV). **Research Journal of Agriculture and Biological Sciences**, Punjab, v. 6, n. 5, p. 607-612, 2010b.

FONSECA, L. N. **Estudo da diversidade de *Potato virus Y* (PVY) em batata (*Solanum tuberosum* L.), no Brasil**. 2003. 72 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Genômicas e Biotecnologia) - Universidade Católica de Brasília, Brasília.

FOOD AGRICULTURE ORGANIZATION. FAOSTAT. **Database Results 2011**. Rome: Food Agriculture Organization. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/site/567/default.aspx#ancor>>. Acesso em: 13 fev. 2013.

FUJI, S.; MITOBE, I.; NAKAMAE, H.; NATSUAKI, K. T. Nucleotide sequence of coat protein gene of *Yam mild mosaic virus*, isolated in Papua New Guinea. **Archives of Virology**, New York, v. 144, n. 7, p. 1415-1419, 1999.

GULATI-SAKHUJA, A.; SEARS, J. L.; NUÑEZ, A.; LIU, H.-Y. Production of polyclonal antibodies against *Pelargonium zonate spot virus* coat protein expressed in *Escherichia coli* and application for immunodiagnosis. **Journal of Virological Methods**, Amsterdam, v. 160, n. 1-2, p. 29-37, 2009.

HOOKER, W. J. **Compendium of potato diseases**. Saint Paul: American Phytopathological Society, 1981. 125 p.

HULL, R. **Matthews' plant virology**. 4<sup>th</sup> ed. San Diego: Academic, 2002. 1001 p.

KASASIAN, L. **Pest control in tropical root crops**. London: Center for Overseas Pest Research, 1978. 235 p. (PANS. Manual, 4).

KAY, D. E.; GOODING, E. G. B. (Eds.). **Root crops**. 2. ed. London: Tropical Development and Research Institute, 1987. 308 p. (Tropical Development and Research Institute. Crop and Product Digest, 2).

KENYON, L.; SHOYINKA, S. A.; HUGHES, J. d'. A.; ODU, B. O. An overview of viruses infecting *Dioscorea* yams in sub-Saharan Africa. HUGHES, J. d'. A.; ODU, B. O. (Eds.). **Plant virology in sub-Saharan Africa (Proceedings...)**. Ibadan: International Institute of Tropical Agriculture, 2001. p. 432-439.

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.

LEBOT, V. Taxonomy and botany. In: LEBOT, V. **Tropical root and tuber crops: cassava, sweet potato, yams and aroids**. Wallingford: CAB International, 2009. cap. 16, p. 191-210. (CAB International. Crop Production Science in Horticulture Series, 17).

LIMA, J. S. **Caracterização molecular de vírus que infectam o inhame (*Dioscorea spp.*) no Nordeste do Brasil**. 2012. 77 f. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife.

LIMA, J. A. A.; LIMA, R. C. A.; GONÇALVES, M. F. B Production of policlonal antisera specific to plant viroses by rabbit oral immunization. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 26, n. 4, p. 774-777, 2001.

LIMA, J. A. A.; NASCIMENTO, A. K. Q.; RADAELLI, P.; PURCIFULL, D. E. Serology applied to plant virology. In: AL-MOSLIH, M. (Org.) **Serological diagnosis of certain human, animal and plant diseases**. Rijeka: In Tech, 2012. v. 1, cap. 6, p. 71-94.

LIMA, J. A. A.; NASCIMENTO, A. K. Q. A simple kit of plate-trapped antigen Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for identification of plant viruses. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE VIROLOGIA, 22; ENCONTRO DE VIROLOGIA DO MERCOSUL, 7.,

2012. Foz do Iguaçu. **Anais...** Campinas: Sociedade Brasileira de Virologia, 2012, v. 17, p. S345-S346.

MAFRA, R. C **Contribuição ao estudo da cultura do cará.** Recife: Universidade Federal Rural de Pernambuco, 20 p. Mimeografado, 1978.

MAFRA, R. C. **Recomendações técnicas para o cultivo do cará.** Brasília: Embrapa Centro Nacional de Pesquisa de Hortaliças, 1996. 15 p.

MONTEIRO, D. A.; PERESSIN, V. A. Cultura do inhame. In: CEREDA, M. P. (Org.). **Agricultura: tuberosas amiláceas latino americanas.** São Paulo: Fundação Cargill, 2002. p. 511-518. (Fundação Cargill. Cultura de Tuberosas Amiláceas Latino Americanas, 2).

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. (Eds.). **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas.** 4. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005. v. 2, p. 415-419.

MOURA, R. M.; OLIVEIRA, I. S.; TORRES, G. R. C. Fitonematoides associados ao inhame da costa em seis municípios produtores da Zona da Mata do Estado de Pernambuco, Brasil. **Nematologia Brasileira**, Campinas, v. 29, n. 2, p. 299-302, 2005.

MUMFORD, R. A.; SEAL, S. E. Rapid single-tube immunocapture RT-PCR for the detection of two yam potyviruses. **Journal of Virological Methods**, Amsterdam, v. 69, n. 1-2, p. 73-79, 1997.

MUNIZ, C. R.; FREIRE, F. C. O.; VIANA, F. M. P.; CARDOSO, J. E.; CORREIA, D.; JALINK, H.; KEMA, G. H. J.; SILVA, G. F.; GUEDES, M. I. F. Polyclonal antibody-based ELISA in combination with specific PCR amplification of internal transcribed spacer regions for the detection and quantitation of *Lasiodiplodia theobromae*, causal agent of gummosis in cashew nut plants. **Annals of Applied Biology**, Warwick, v. 160, n. 3, p. 217-224, 2012.

MURPHY, F. A.; FAUQUET, C. M.; BISHOP, D. H. L.; GHABRIAL, S. A.; JARVIS, A. W.; MARTELLI, G. P.; MAYO, M. A.; SUMMERS, M. D. Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses. In: REPORT OF THE INTERNATIONAL COMMITTEE ON TAXONOMY OF VIRUSES, 6., 1995, New York. **Proceedings...** New York, p. 348-358. 1995.

ODU, B. O.; ASIEDU, R.; SHOYINKA, S. A.; HUGHES, J. d' A. Screening of water yam (*Dioscorea alata* L.) genotypes for reactions to viruses in Nigeria. **Journal of Phytopathology**, Berlim, v. 154, n. 11-12, p. 716-724, 2006.

OLIVEIRA, I. S.; LUZ, E. D. M. N.; MOURA, R. M.; MAIA, L. C. Distribuição geográfica e diversidade morfológica de culturas de *Penicillium sclerotigenum* em inhames no Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 32, n. 2, p. 131-136, 2007.

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.

PAULA, H. **Variabilidade de isolados de *Curvularia eragrostidis* (Henn.) Meyer causando queima das folhas do inhame (*Dioscorea cayennensis* Lam.) no estado de Pernambuco.** 2000. 33 f. Dissertação (Mestrado em Fitossanidade) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife.

PIO-RIBEIRO, G.; ANDRADE, G. P.; FILLOUX, D.; VERNIER, P.; MELO-FILHO, P. A.; ALMEIDA, H. S. M.; XAVIER, A. S. Plantas de inhame em Pernambuco e Paraíba apresentam infecções simples e mista por *Potyvirus* e *Badnavirus*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, 39., 2006. Salvador. **Anais...** Brasília: Sociedade Brasileira de Fitopatologia, 2006, v. 31, p. S309-S309.

QUEIROZ, J. V. J.; PIO-RIBEIRO, G.; FARIAS, J. S.; ANDRADE, G. P.; ARAÚJO, A. L. R. Ocorrência de YMV e YMMV em inhame (*Diocorea trifida*) em Pernambuco. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, 42., 2009. Rio de Janeiro. **Anais...** Brasília: Sociedade Brasileira de Fitopatologia, 2009, v. 34, p. S271-S271.

RABELO-FILHO, F. A. C.; LIMA, J. A. A.; RAMOS, N. F.; GONÇALVES, M. F. B.; CARVALHO, K. F. Produção de anti-soro para o vírus do mosaico da abóbora mediante imunização oral de coelhos. **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v. 36, n. 3, p. 344-347, 2005.

RABELO-FILHO, F. A. C.; NICOLINI, C.; RESENDE, R. O.; ANDRADE, G. P.; 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.

RADAELLI, P.; FAJARDO, T. V. M.; NICKEL, O.; EIRAS, M.; PIO-RIBEIRO, G. Production of polyclonal antisera using recombinant coat proteins of *Grapevine leafroll-associated virus 2* and *Grapevine virus B*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 43, n. 10, p. 1405-1411, 2008.

RITZINGER, C. H. S. P.; SANTOS-FILHO, H. P.; ABREU, K. C. L. M.; FANCELLI, M.; RITZINGER, R. **Aspectos fitossanitários da cultura do inhame**. Cruz das Almas: Embrapa Centro Nacional de Pesquisa de Mandioca e Fruticultura. Tropical, 2003. 34 p. (Embrapa Centro Nacional de Pesquisa de Mandioca e Fruticultura. Tropical. Documentos, 105).

SANTOS, E. S. **Inhame (*Dioscorea spp.*): aspectos básicos da cultura**. João Pessoa: Empresa Estadual de Pesquisa Agropecuária da Paraíba S. A.; SEBRAE, 1996. 158 p.

SANTOS, E. S. **Cultura do inhame (*Dioscorea sp.*)**. João Pessoa: Empresa Estadual de Pesquisa Agropecuária da Paraíba S.A. 2002. 12 p.

SANTOS, E. S.; CAZÉ-FILHO, J.; LACERDA, J. T.; CARVALHO, R. A.; FONTINÉLLI, I. S. C.; SILVA, J. B.; BARBOSA, M. M.; CASSIMIRO, C. M. **Inhame e preservação ambiental**. João Pessoa, PB: Embrapa; Emepa, 2006. 6 p.

SANTOS, E. S.; CAZÉ-FILHO, J.; LACERDA, J. T.; CARVALHO, R. A. Inhame (*Dioscorea sp.*) tecnologias de produção e preservação ambiental. **Tecnologia & Ciência Agropecuária**, João Pessoa, v. 1, n. 1, p. 31-36, 2007a.

SANTOS, E. S.; CEREDA, M. P.; PEDRALLI, G.; PUIATTI, M. Denominações populares das espécies de *Dioscorea* e *Colocasia* no Brasil. **Tecnologia & Ciência Agropecuária**, João Pessoa, v. 1, n. 1, p. 37-41, 2007b.

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.

SANTOS, E. S.; MACÊDO, L. S. **Tendências e perspectivas da cultura do inhame (*Dioscorea* sp.) no Nordeste do Brasil**. João Pessoa: Empresa Estadual de Pesquisa Agropecuária da Paraíba S.A., 2002. Disponível em: <<http://www.emepa.org.br/anais/volume1/av101.pdf>>. Acesso em: 05 dez. 2012.

SEQUEIRA, Z.; NOLASCO, G. Bacterial expressed coat protein: development of a single antiserum for routine detection of *Citrus tristeza virus*. **Phytopathologia Mediterranea**, Bologna, v. 41, n. 1, p. 55-62, 2002.

SINGH, L.; HALLAN, V.; RAM, R.; ZAIDI, A. A. Expression of recombinant *Chrysanthemum virus B* coat protein for raising polyclonal antisera. **Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology**, New Delhi, v. 20, n. 1, p. 96-101, 2011.

SMITH, O. P.; DURKIN, S. A.; LUSTER, D. G.; McDANIEL, L. L.; RUSSO, A. J.; DAMSTEEGT, V. D. Sequence and expression in *Escherichia coli* of the coat protein gene of the dwarfing strain of *Soybean dwarf luteovirus*. **Virus Genes**, Boston, v. 17, n. 3, p. 207-211, 1998.

URCUQUI-INCHIMA, S.; HAENNI, A. L.; BERNARDI, F. *Potyvirus* proteins: a wealth of functions. **Virus Research**, Paris, v. 74, n. 1-2, p. 157-175, 2001.

WEI, T.; ZHANG, C.; HONG, J.; XIONG, R.; KASSCHAU, K. D.; ZHOU, X.; CARRINGTON, J. C.; WANG, A. Formation of complexes at plasmodesmata for potyvirus

intercellular movement is mediated by the viral protein P3N-PIPO. **PLoS Pathogens**, San Francisco, v. 6, n. 6, e1000962, 12 f., 2010.

WEN, R. H, HAJIMORAD, M. R. Mutational analyses of the putative *pipo* of *Soybean mosaic virus* suggests disruption of PIPO protein impedes movement. **Virology**, New York, v. 400, n. 1, p. 1-7, 2010.



## CAPÍTULO II

---

---

**The complete genome sequence of a Brazilian isolate of *Yam mild mosaic virus***

1 **CAPÍTULO II - The complete genome sequence of a Brazilian isolate of *Yam mild***  
2 ***mosaic virus***

3 Francisco de Assis Câmara Rabelo-Filho<sup>1</sup>, Cícero Nicolini<sup>2</sup>, Renato de Oliveira Resende<sup>2</sup>,  
4 Genira Pereira de Andrade<sup>1</sup>, Gilvan Pio-Ribeiro<sup>1</sup>, Tatsuya Nagata<sup>2</sup>

5

6 <sup>1</sup> Laboratório de Fitovirologia, Departamento de Agronomia, Universidade Federal Rural de  
7 Pernambuco, CEP 52171-900, Recife-PE, Brazil

8 <sup>2</sup> Laboratório de Microscopia Eletrônica, Departamento de Biologia Celular, Universidade de  
9 Brasília, CEP 70910-900, Brasília-DF, Brazil

10

11 Corresponding author: Tatsuya Nagata

12 E-mail address: [tatsuya@unb.br](mailto:tatsuya@unb.br)

13 Telephone: +55-61-3107-2980

14 Fax: +55-61-3107-2904

**15 Abstract**

16 In this study, the complete genome of an isolate of *Yam mild mosaic virus* (YMMV) from  
17 Brazil was sequenced, and the predicted amino acid sequence was analyzed. The YMMV  
18 RNA genome consists of 9538 nt without the poly(A) tail, encoding a putative typical  
19 potyvirus polyprotein of 3084 amino acids. Furthermore, the small overlapping ORF (PIPO)  
20 in the P3 gene was also deduced, and the cleavage sites of the polyprotein were predicted.  
21 Multiple alignment with other potyviruses showed a maximum nucleotide identity of 64% to  
22 *Wild tomato mosaic virus*. A phylogenetic tree showed that YMMV clustered with Asian  
23 potyviruses that mainly infect solanaceous plants.

24 Keywords: Yam, *Potyvirus*, cloning, proteins

25

26

**27 Resumo**

28

29 Neste estudo, o genoma completo de um isolado de *Yam mild mosaic virus* (YMMV)  
30 do Brasil foi sequenciado e a sequência de aminoácidos prevista foi analisada. O RNA  
31 genômico do YMMV consiste de 9538 nucleotídeos, excluindo a cauda Poly A, que codifica  
32 para uma poliproteína típica de potyvírus com 3084 aminoácidos. Além disso, uma pequena  
33 ORF sobreposta (PIPO) no gene P3 foi também deduzida e os sítios de clivagem da  
34 poliproteína foram preditos. Alinhamento múltiplo com outros potyvírus mostrou uma  
35 identidade máxima de 64% dos nucleotídeos para *Wild tomato mosaic virus*. Uma árvore  
36 filogenética mostrou que o YMMV agrupou com potyvírus asiáticos que infectam  
37 principalmente solanáceas.

38 Palavras-chave: Inhame, *Potyvirus*, clonagem, proteínas

39 Yams are members of the genus *Dioscorea*, and there are over 600 varieties of yams,  
40 several of which are important crops, producing tubers used as nutrient sources for people in  
41 developing countries. In Brazil, *D. alata*, *D. rotundata* and *D. trifida* are the most frequently  
42 cultivated yam species [3, 14, 15]. Several viruses infect yams, amongst them, *Yam mild*  
43 *mosaic virus* (YMMV), which is a common potyvirus pathogen found on different continents  
44 of the world [9, 19].

45 The genus *Potyvirus* is currently the second largest genus [11] of plant viruses that  
46 infect many economically important crops. The potyvirus genomic RNA possesses a large  
47 open reading frame (ORF), which encodes 10 functional proteins: P1, HC-Pro, P3, 6K1, CI,  
48 6K2, NIa-VPg, NIa-Pro, NIb and CP [1, 16]. Recently, another ORF (pretty interesting  
49 *Potyviridae* ORF; PIPO) [7] that is involved in viral movement [17, 18] was described.

50 YMMV has also been detected in Brazil in some commercial yam plants, and its  
51 genome has been partially analyzed [3, 15]. The objective of the present study was to  
52 determine the complete nucleotide sequence of YMMV and analyze predicted proteins in  
53 relation to other potyviruses.

54 *D. trifida* leaves showing mosaic symptoms were collected in Paudalho City,  
55 Pernambuco State, Brazil, in 2009, and the presence of YMMV was confirmed by reverse  
56 transcription (RT)-PCR using a pair of specific primers according to Mumford and Seal [13]  
57 (data not shown). Total RNA was extracted from one plant infected with YMMV using Plant  
58 RNA Reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) according to the manufacturer's instructions.  
59 The first strand of cDNA was synthesized using an oligo(dT)<sub>50</sub> PacIM4 primer (5'-TCA GCA  
60 CTG ACC CTT TTG AAT TAA T<sub>50</sub>-3') with Superscript III reverse transcriptase  
61 (Invitrogen). PCR was performed using the 3' RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends)  
62 protocol with an anchor primer, M4 (5'-TCA GCA CTG ACC CTT TTG-3'), and a  
63 degenerate oligonucleotide referred to as potyvirus genus PY-11 (5'-GGN AAY AAY AGY  
64 GGN CAR CC-3') [6], which targets a conserved region of the NIb gene (expected size of  
65 PCR products, ca. 1.7 kb). The PCR conditions were as follows: pre-cycle treatment of 95 °C  
66 for 2 min, then 35 cycles of 94 °C (30 s), 47 °C (1 min) and 72 °C (2 min), and one post-cycle  
67 incubation step of 72 °C for 15 min using Taq DNA polymerase (Phoneutria, Belo Horizonte,  
68 MG, Brazil). The PCR product of 1.7 kb was cloned in pGEM-T Easy Vector (Promega,  
69 Madison, WI, USA), and four clones were selected for sequencing (Macrogen, Seoul, South  
70 Korea). From this partial genome sequence of the 3' end, new primers were designed to  
71 recover the main part of the viral genome by RT-PCR. The recovered cDNA fragments of ca.

72 6 kb obtained with a specific primer, YMMV17k Rev (5'-CTT CAG CAT CGC ATA TTG  
73 TA-3'), and a degenerate primer, Py-2333 For (5'-ACG ATG CAT GTN ATY GAT TCA T-  
74 3'), were cloned into pCR4 (Invitrogen) vector, and four selected clones were sequenced as  
75 described above. Based on this sequence of 6 kb, one specific reverse primer, YMMV 5-Rev  
76 (5'-GAC TGT CGT AGC GTT CAT TA-3'), was designed to recover the 5' region upstream  
77 of the 6-kb fragment with the degenerate primer YMMV 5-For (5'-CCA TGT KGT AGV  
78 ATM ACA TG-3'). The resulting cDNA fragments (1.2 kb) were cloned, and three selected  
79 clones were sequenced. Finally, to recover the 5'- terminal region of YMMV genome, the 5'  
80 RACE protocol (System for Rapid Amplification of cDNA Ends kit, Invitrogen) was used  
81 according to manufacturer's instructions. The first-strand cDNA was synthesized from total  
82 RNA of the infected plant using the GSP1 reverse primer (5'-TGC CTC TCA ATA AAC  
83 ACT CAT-3'), followed by PCR with the nested GSP2 primer (5'-AGA ACT GGA TTT  
84 TTC CAC TCG-3') and the anchor forward primer supplied in the kit (Invitrogen). The  
85 amplified cDNA of the 5' genomic region (1.4 kb) was cloned into the pCR4 vector  
86 (Invitrogen), and six clones were selected and sequenced. The sequences that were obtained  
87 were assembled using the Staden package (<http://staden.sourceforge.net/>). The identity of the  
88 nucleotide sequence was confirmed using BlastN (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).  
89 Multiple sequence alignment of YMMV and 35 related potyvirus genomes was performed  
90 using the Clustal W program included in the MEGA5 (<http://www.megasoftware.net/>)  
91 software package, which was also used in the phylogenetic analysis. The phylogenetic  
92 relationships among sequences were inferred by the maximum-likelihood method using the  
93 general time-reversible model, with 1000 bootstrap replications.

94 The complete YMMV genome determined here (GenBank no. JX470965) had 9538  
95 nucleotides (nt), excluding of the poly(A) tail and encoded a putative polyprotein of 3084  
96 amino acids (aa) with molecular mass of ca. 351 kDa. The 5' UTR was composed of 140 nt,  
97 while the 3' UTR region (without the poly(A) tail) consisted of 146 nt. The genome  
98 organization of YMMV is typical of viruses of the genus *Potyvirus*. The YMMV polyprotein  
99 cleavage sites were predicted using multiple alignment with complete genomes of related  
100 potyviruses and based on criteria proposed by Adams et al. [2] and the Descriptions of Plant  
101 Viruses website (<http://www.dpvweb.net/potycleavage/index.html>). They were as follows:  
102 ITHY/SV (P1/HC-Pro); YRVG/GI (HC-Pro/P3); VEHQ/AK (P3/6K1); VAHQ/SL (6K1/CI);  
103 VLHQ/SQ (CI/6K2); VTHQ/GK (6K2/NIa-VPg); VIHE/GD (NIa-VPg/NIa-Pro); VVEQ/SL  
104 (NIa-Pro/NIb); VIHQ/AS (NIb/CP).

105 The coat protein (CP) gene of YMMV is 798 nt long and potentially codes for a  
106 protein of 266 aa and 30 kDa. This protein has a DAG motif that is present in most potyvirus  
107 CPs [4] and is important for aphid transmissibility, although some potyviruses lack this motif  
108 [12].

109 PIPO was first described for *Turnip mosaic virus* (TuMV) [7] as an ORF overlapping  
110 with the P3 gene and containing 180 nt with a frame-shifting motif of G<sub>2</sub>A<sub>6</sub>. According to the  
111 authors, viruses of the genus *Potyvirus* have a conserved motif (G<sub>1-2</sub>A<sub>6-7</sub>) within the P3 gene  
112 that serves as the initiation site of the PIPO ORF. The YMMV PIPO has 201 nucleotides,  
113 encoding 67 aa, initiating with a conserved motif of GAAAAAA in frame 3, the same motif  
114 as is found in the *Soybean mosaic virus* (SMV) PIPO [18]. The YMMV PIPO is 21 nt longer  
115 than the TuMV PIPO and 24 nt shorter than the SMV PIPO. The PIPO nucleotide length can  
116 be variable in potyviruses according to the position of the stop codon, which is caused by  
117 silent mutations within the P3 reading frame. Cuevas et al. [8] explained that the length and  
118 variability of the PIPO ORF can be partly explained by host-driven adaptation.

119 Multiple sequence alignment was performed using the YMMV sequence and 35  
120 complete genome sequences of related potyviruses available in the DDBJ/EMBL/GenBank  
121 databases. YMMV shared the highest nucleotide sequence identity of 64% with *Wild tomato*  
122 *mosaic virus* (WTMV) and 63% with *Sweet potato feathery mottle virus*, *Sweet potato virus*  
123 *C*, *Japanese yam mosaic virus*, *Pepper veinal mottle virus* (PVMV) and *Chilli veinal mottle*  
124 *virus* (ChiVMV). Using a pairwise comparison of amino acid sequences, maximum identities  
125 (50-51%) were observed with *Chilli ringspot virus* (ChiRSV), ChiVMV, PVMV, *Tobacco*  
126 *vein banding mosaic virus* (TVBMV) and WTMV.

127 Based on the ICTV criteria for potyvirus species demarcation (complete nucleotide  
128 sequences) [1, 11], YMMV is a distinct potyvirus, as previously suggested based on CP gene  
129 analysis [5, 9]. The phylogenetic tree constructed on the basis of complete nucleotide genome  
130 sequences showed that YMMV is more closely related to members of the ChiVMV cluster  
131 [10], which includes ChiRSV, ChiVMV, PVMV, TVBMV and WTMV (Fig. 1). This cluster,  
132 referred to as Group 5 or the ChiVMV group by Gibbs and Ohshima [10], predominantly  
133 comprises potyviruses whose primary hosts are solanaceous plants. Interestingly, most  
134 members of group 5 were first isolated and are mainly distributed in Asian countries. Based  
135 on this clustering, YMMV is suggested to have an evolutionary origin in Asia. A similar  
136 conclusion was suggested by Bousalem et al. [5], who analyzed CP genes of 54 YMMV  
137 isolates and the historical dispersion of *Dioscorea* species. This corroborates our notion,

138 which is based on the interspecific genomic analysis in this study. Possible recombination  
139 events and the genetic distance between YMMV and the other potyviruses of group 5 were  
140 evaluated using the RDP3 program (<http://darwin.uvigo.es/rdp/rdp.html>). The distance plot  
141 showed low probability of interspecific recombination, and no clear recombination signals  
142 were observed (Supplementary Fig.1).

143

#### 144 **Acknowledgments**

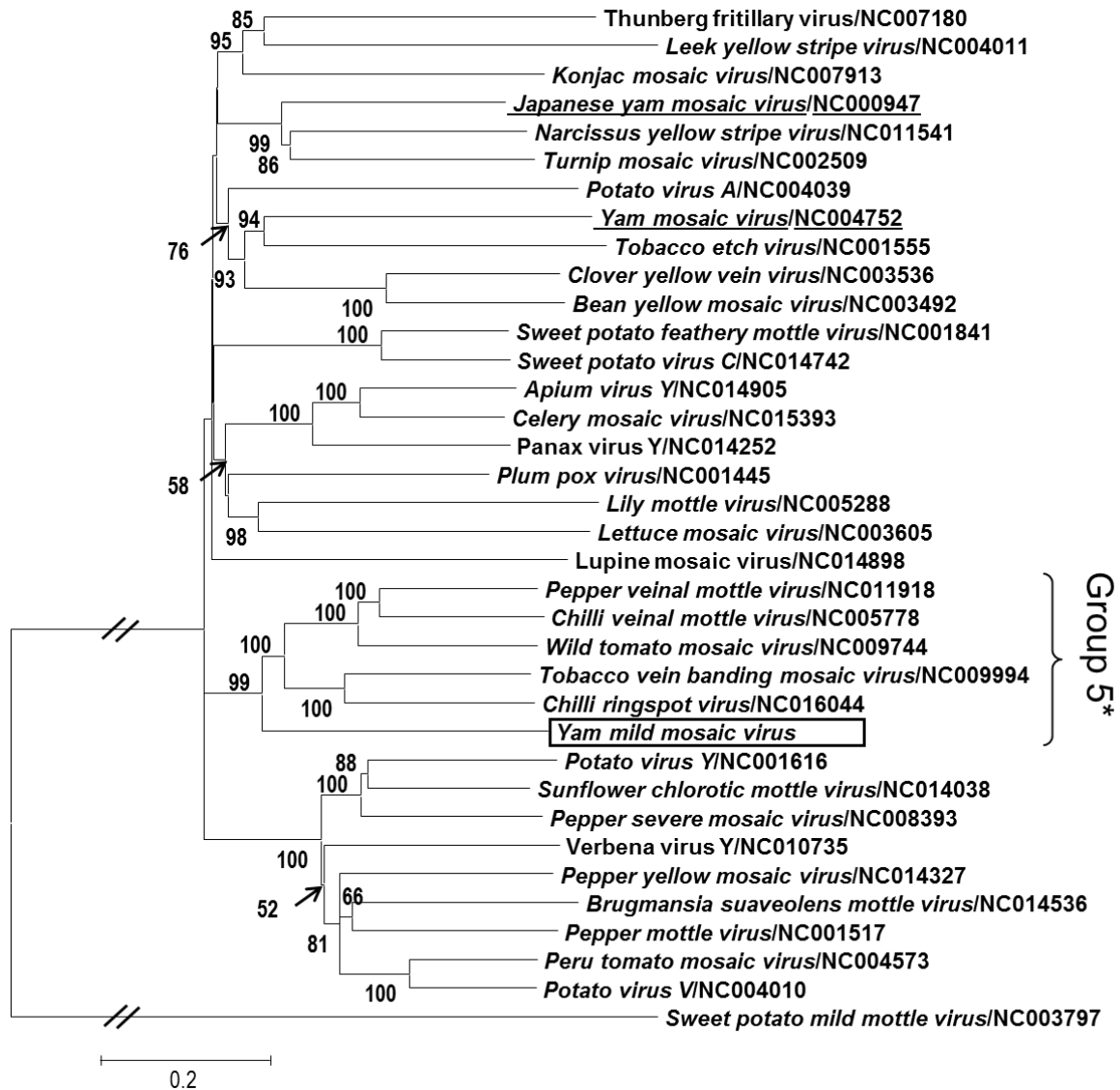
145 The authors wish to thank Fernanda Araújo Ferreira for her critical review of the manuscript,  
146 and “National Council for Scientific and Technological Development” (CNPq) for the DSc  
147 scholarship granted to the first author (141274/2009-3). The second, third and sixth authors  
148 were supported financially by CNPq as research fellows.

#### 149 **References**

- 150 1. Adams MJ, Antoniw JF, Fauquet CM (2005) Molecular criteria for genus and species  
151 discrimination within the family *Potyviridae*. *Arch Virol* 150:459–479
- 152 2. Adams MJ, Antoniw JF, Beaudoin F (2005) Overview and analysis of the polyprotein  
153 cleavage sites in the family *Potyviridae*. *Mol Plant Pathol* 6:471–487
- 154 3. Andrade GP, Silva AKS, Filloux D, Pio-Ribeiro G, Kitajima EW, Xavier DM, Nascimento  
155 RJ (2006) Ocorrência de YMMV em *Dioscorea alata* no Estado de Pernambuco. *Fitopatol*  
156 *Bras* 31:S344
- 157 4. Atreya CD, Raccach B, Pirone TP (1990) A point mutation in the coat protein abolishes  
158 aphid transmissibility of a potyvirus. *Virology* 178:161–165
- 159 5. Bousalem M, Dallot S, Fuji S, Natsuaki, KT (2003) Origin, world-wide dispersion, bio-  
160 geographical diversification, radiation and recombination: an evolutionary history of *Yam*  
161 *mild mosaic virus* (YMMV). *Infect Genet Evol* 3:189–206
- 162 6. Chen J, Chen J, Adams MJ (2001) A universal PCR primer to detect members of the  
163 *Potyviridae* and its use to examine the taxonomic status of several members of the family.  
164 *Arch Virol* 146:757–766
- 165 7. Chung BYW, Miller WA, Atkins JF, Firth AE (2008) An overlapping essential gene in the  
166 *Potyviridae*. *Proc Natl Acad Sci USA* 105:5897–5902
- 167 8. Cuevas JM, Delaunay A, Visser JC, Bellstedt DU, Jacquot E, Elena SF (2012)  
168 Phylogeography and molecular evolution of *Potato virus Y*. *PLoS ONE*.: doi:  
169 10.1371/journal.pone.0037853

- 170 9. Fuji S, Mitobe I, Nakamae H, Natsuaki KT (1999) Nucleotide sequence of coat protein  
171 gene of *Yam mild mosaic virus*, isolated in Papua New Guinea. Arch Virol 144:1415–1419
- 172 10. Gibbs A, Ohshima K (2010) Potyviruses and the Digital Revolution. Annu Rev  
173 Phytopathol 48:205–223
- 174 11. King AMQ, Adams MJ, Carstens EB, Lefcowits EJ (2012) Virus Taxonomy: Ninth  
175 Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses - ICTV. Academic  
176 Press\Elsevier: London
- 177 12. Lucinda N, Rocha WB, Inoue-Nagata AK, Nagata T (2012) Complete genome sequence  
178 of *Pepper yellow mosaic virus*, a potyvirus, occurring in Brazil. Arch Virol 157:1397-1401
- 179 13. Mumford RA, Seal SE (1997) Rapid single-tube immunocapture RT-PCR for the  
180 detection of two yam potyviruses. J Virol Methods 69:73–79
- 181 14. Pio-Ribeiro G, Andrade GP, Filloux D, Vernier P, Melo-Filho PA, Almeida HSM, Xavier  
182 AS (2006) Plantas de inhame em Pernambuco e Paraíba apresentam infecções simples e  
183 mista por potyvirus e badnavirus. Fitopatol Bras 31:S309
- 184 15. Queiroz JVJ, Pio-Ribeiro G, Farias JS, Andrade GP, Araújo ALR (2009) Ocorrência de  
185 YMV e YMMV em inhame (*Dioscorea trifida*) em Pernambuco. Trop Plant Pathol  
186 34:S271
- 187 16. Urcuqui-Inchima S, Haenni AL, Bernardi F (2001) Potyvirus proteins: a wealth of  
188 functions. Virus Res 74:157–175
- 189 17. Wei T, Zhang C, Hong J, Xiong R, Kasschau KD, Zhou X, Carrington JC, Wang A  
190 (2010) Formation of complexes at plasmodesmata for potyvirus intercellular movement is  
191 mediated by the viral protein P3N-PIPO. PLoS Pathog. doi:10.1371/journal.ppat.1000962
- 192 18. Wen RH, Hajimorad MR (2010) Mutational analyses of the putative *pipo* of *Soybean*  
193 *mosaic virus* suggests disruption of PIPO protein impedes movement. Virology 400:1–7
- 194 19. Zou C, Meng J, Li Z, Wei M, Song J, Chen B, Wei B (2011) First report of *Yam mild*  
195 *mosaic virus* in yam in Guangxi province, China. Plant Dis 95:1320

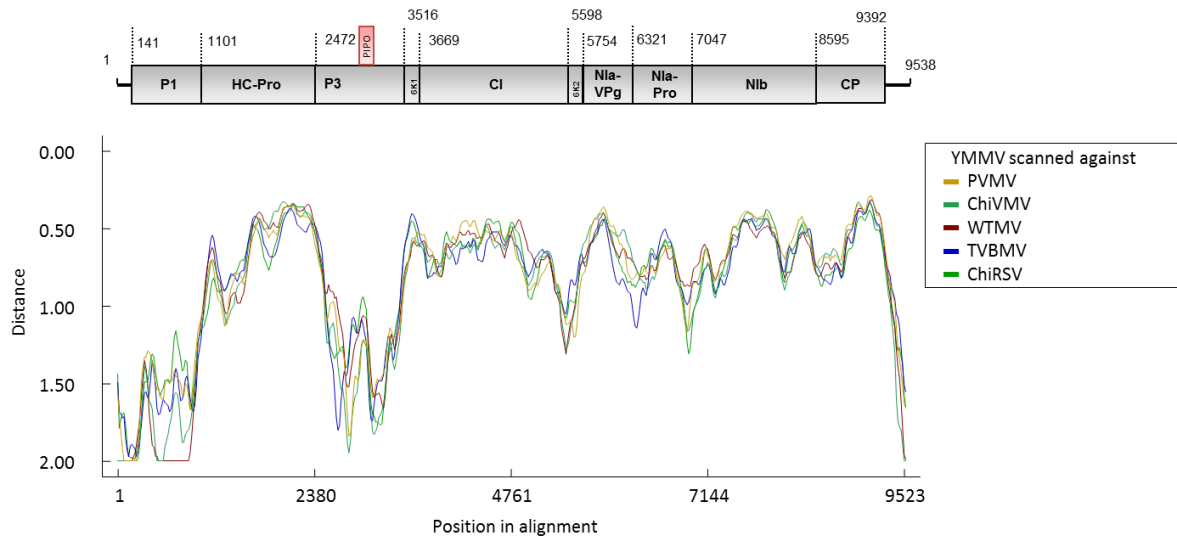




196

197 **Fig. 1** Phylogenetic tree based on the complete nucleotide sequences of YMMV and related  
 198 potyviruses using the maximum-likelihood method. Only bootstrap values higher than 50%  
 199 are shown at the nodes of the tree. Group 5 refers to the *Chilli veinal mottle virus* group  
 200 according to Gibbs and Ohshima [10]. The names of other yam-infecting viruses, *Yam mosaic*  
 201 *virus* and *Japanese yam mosaic virus*, are underlined.

202



203

204 **Supplementary Figure 1.** The distance plot along the entire genomes of YMMV and five  
 205 related potyviruses *Chilli ringspot virus* (ChiRSV), *Chilli veinal mottle virus* (ChiVMV),  
 206 *Pepper veinal mottle virus* (PVMV), *Tobacco vein banding mosaic virus* (TVBMV), and *Wild*  
 207 *tomato mosaic virus* (WTMV). The numbers above the genome indicate the nucleotide  
 208 position of each cistron in the YMMV genome.

209

210

211

212

213

214

215

216

217

### CAPÍTULO III

---

---

**Genetic similarity of *Yam mild mosaic virus* is more related to host than geographical factor**

1

2 **CAPÍTULO III - Genetic similarity of *Yam mild mosaic virus* is more related to host**  
3 **than geographical factor**

4 Francisco de Assis Câmara Rabelo-Filho<sup>1</sup>; Tatsuya Nagata<sup>2\*</sup>; Cícero Nicolini<sup>2</sup>; Felipe  
5 Coutinho Guimarães<sup>2</sup>; Renato de Oliveira Resende<sup>2</sup>; Genira Pereira de Andrade<sup>1</sup>; Elliot  
6 Watanabe Kitajima<sup>3</sup>; Gilvan Pio-Ribeiro<sup>1</sup>

7

8 <sup>1</sup> Laboratório de Fitovirologia, Departamento de Agronomia, Universidade Federal Rural de  
9 Pernambuco, CEP 52171-900, Recife-PE, Brazil

10 <sup>2</sup> Laboratório de Microscopia Eletrônica, Departamento de Biologia Celular, Universidade de  
11 Brasília, CEP 70910-900, Brasília-DF, Brazil

12 <sup>3</sup> Núcleo de Apoio à Pesquisa em Microscopia Eletrônica Aplicada a Agricultura,  
13 Departamento de Fitopatologia e Nematologia, Universidade de São Paulo, ESALQ, CEP  
14 13418-900, Piracicaba-SP, Brazil

15

16 \*Corresponding author: [tatsuya@unb.br](mailto:tatsuya@unb.br)

17

**Abstract**

Leaf samples of *Dioscorea trifida* showing mosaic symptom were collected in Paudalho City, state of Pernambuco, Brazil. Cytoplasmic inclusion bodies characteristic of potyvirus infection were observed in symptomatic leaf cells by transmission electron microscopy. Aiming to identify this potyvirus species, RT-PCR was performed using a degenerated primer for the genus *Potyvirus* with 3'RACE protocol. The resulting amplified cDNA fragments of 1.7 Kb corresponding to partial NIB and complete coat protein (CP) genes were cloned and sequenced. Based on the complete CP gene sequence analysis, this potyvirus isolate was identified as *Yam mild mosaic virus* (YMMV). The phylogenetic tree based on the CP nucleotide sequence showed that the viral host-specific ramification rather than geographic distribution-based ramification. This YMMV isolate was phylogenetically related to the YMMV isolates from Costa Rica, Guadalupe and French Guiana.

30

**Keywords:** *Potyviridae*, electron microscopy, yam, *Dioscorea trifida*

32

33

**Resumo**

Amostras foliares de *Dioscorea trifida* apresentando sintomas de mosaico foram coletadas na cidade de Paudalho, Estado de Pernambuco, Brasil. Inclusões citoplasmáticas características da infecção por potyvirus foram observadas em células de folhas sintomáticas por microscopia eletrônica de transmissão. Buscando identificar a espécie de potyvirus, RT-PCR foi realizada usando um par de *primers* degenerados para o gênero *Potyvirus* com o protocolo do 3'RACE. Os fragmentos de cDNA resultantes com 1,7 Kb, correspondendo a parte do gene NIB e o gene completo da capa proteica (CP), foram clonados e sequenciados. A análise da sequência completa do gene da CP revelou a identidade do vírus como *Yam mild mosaic virus* (YMMV). A árvore filogenética baseada na sequência de nucleotídeo da CP mostrou uma ramificação específica para o hospedeiro em vez de uma ramificação baseada na distribuição geográfica do vírus. O isolado de YMMV mostrou-se filogeneticamente relacionado aos isolados de YMMV provenientes da Costa Rica, Guadalupe e Guiana Francesa.

**Palavras-chaves:** *Potyviridae*, microscopia eletrônica, inhame, *Dioscorea trifida*

49

## 50 **Introduction**

51 Yam (*Dioscorea* spp.) is classified as monocotyledonous plants in the family  
52 Dioscoreaceae, genus *Dioscorea*. This genus includes more than 600 species, some of them  
53 produce tubers that are used as human food. These plants are cultivated from tropical to sub-  
54 tropical climate zones (Montaldo, 1991; Santos, 2002; Santos et al., 2007). The yam tuber is  
55 considered a rich food source in carbohydrates, proteins, vitamins and fibers (Wanasundera  
56 and Ravindran, 1994; Santos, 2002; Bhandari et al., 2003).

57 In Northeast of Brazil, yam has a high socio-economic importance, especially in the  
58 states of Paraíba, Pernambuco, Alagoas, Bahia and Maranhão. However, the tuber yield in  
59 this region is limited by factors, such as inefficient irrigation, poor fertilization and losses  
60 caused by insect damage and diseases. This food crop promotes employment and income, and  
61 also is an important nutrient source for the population (Santos, 2002).

62 The viruses that infect yam are disseminated in the cultivation systems by successive  
63 vegetative propagation. Mixed viral infections downsize the tuber development, in  
64 consequence, unable to be commercialized. Due to lack of disease-free seed tuber supply  
65 (Loebenstein and Thottappilly, 2003; Andrade, 2007; Andrade et al., 2007), in Brazil, many  
66 farmers use infected tubers as seeds, spreading the viruses to new areas (Andrade, 2007;  
67 Andrade et al., 2007).

68 Plants of yam, including *D. trifida* L., *D. alata* L. and *D. rotundata* Poir. are  
69 commonly infected by virus species from the genera *Badnavirus*, *Cucumovirus* and *Potyvirus*  
70 (Kenyon et al., 2001; Andrade et al., 2006; Odu et al., 2006; Pio-Ribeiro et al., 2006;  
71 Andrade 2007; Queiroz et al., 2009; Asala et al., 2012). In Brazil, the occurrence of *Yam mild*  
72 *mosaic virus* (YMMV) and *Yam mosaic virus* (YMV) were reported in commercial fields,  
73 based on molecular tests (Pio-Ribeiro et al., 2005, Andrade et al., 2006; Pio-Ribeiro et al.,  
74 2006; Queiroz et al., 2009). However, the complete CP gene sequence analysis has not been  
75 reported in former studies in Brazil

76 The objective of present study was the characterization of the etiological agent  
77 infecting *Dioscorea trifida* L. isolated in Paudalho City, Pernambuco State, Brazil by  
78 transmission electron microscopy and analysis of complete CP gene sequencing for  
79 taxonomic study.

80

## 81 **Material and Methods**

82

### 83 **Isolate maintenance**

84 Plants of *D. trifida* showing mosaic symptoms were collected in Paudalho,  
85 Pernambuco State, transplanted in pots of 8 L and maintained under greenhouse conditions.  
86 One viral isolate collected and used in this study was named Paudalho-PE isolate.

87

### 88 **Electron Microscopy**

89 For the observation of possible virus particles and/or inclusions by transmission  
90 electron microscopy, ultrathin sections of leaf samples were prepared after blocking in Spurr  
91 resin according to (Souza et al., 1998) with slight modification. Observation was done using  
92 transmission electron microscope JEM 1011 (JEOL).

93

### 94 **RT-PCR by 3'RACE**

95 Total RNA was extracted from infected leaf using Plant RNA Reagent (Invitrogen,  
96 Carlsbad, CA, USA), according to manufacturer's instruction. The first strand of cDNA was  
97 synthesized using M-MLV (Invitrogen) and oligodT primer containing anchor sequence for 3'  
98 RACE protocol (OligodT<sub>50</sub>PacIM4) (Lucinda et al., 2010) with standard protocol. The  
99 following PCR was done using anchor primer M4 (5'-GTT TTC CCA GTC ACG AC 3') and  
100 potyviral degenerated primer PY-11 (5'-GGX AAY AAY AGY GGX CAZ CC-3') (Chen et  
101 al., 2001) refers to partial NIb and complete cp genes to *Potyvirus* genus. The condition of  
102 PCR was pre-cycle treatment of 95 °C for 2 min, then 35 cycles of 94 °C (30 seg), 47 °C (1  
103 min) and 72 °C, (2 min) and one post-cycle incubation step of 72 °C for 15 min.

104

### 105 **Cloning and Sequencing**

106 The resulting PCR product of c.a. 1.7 Kb was cloned in pGEM-T Easy plasmid vector  
107 (Promega, Madison, WI, USA) and clones were selected by EcoRI digestion confirming the  
108 size of inserted cDNA. Plasmid DNA was prepared using PureLink Quick Plasmid Miniprep  
109 Kit (GE Healthcare, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK) and sequenced by MacroGen  
110 (Seoul, South Korea). Three independent clones were sequenced and consensus sequence was  
111 assembled.

112

### 113 **Sequence analysis**

114       Obtained sequence was filtered and the contig was assembled by Staden package  
115 (Bonfield et al., 1995). The identity of YMMVcp nucleotide sequence was confirmed by  
116 BlastN (www.ncbi.nlm.nih.gov). Multiple alignment of 35 sequences of YMMV retrieved  
117 from GenBank and analysis was performed using ClustalW  
118 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>). Nucleotide phylogenetic tree was constructed  
119 using Maximum-likelihood method with Tamura 3-parameter substitution model of MEGA  
120 5.0 (Tamura et al., 2011) with bootstrap of 1000 replications.

121

### 122 **Results and Discussion**

123

124 The electron microscopy analysis shows the presence of cytoplasmic laminated inclusions  
125 (Figure 1) of the subdivision II according to Edwardson and Christie (1978); Edwardson et al.,  
126 (1984). These authors developed an inclusion body classification based on the morphology to  
127 distinguish viruses of different genera. Other virus particles or inclusion were not observed in  
128 this study.

129       The comparison of cp nucleotide sequences identified the Paudalho-PE isolate as  
130 YMMV. The most related isolate of YMMV was from *D. trifida* obtained in French Guiana  
131 (AF 548512) with the pairwise distance value (Tamura 3-parameter model) of 0.104 (90%  
132 identity) and the isolate less related was from *D. alata* obtained in Japan (AF548521) with the  
133 distance value of 0.197 (83% identity). Interestingly, one Brazilian isolate from *D. alata*  
134 (AF548498), reported by Bousalem et al. (2003), was quite distantly related with Paudalho-  
135 PE isolate, distance value of 0.183 (84% identity). The host species of YMMV can be more  
136 important factor than geographical distance in genomic relationship.

137       This observation (host species > geographical distance) can be confirmed by the  
138 phylogenetic analysis (Figure 2). The phylogenetic tree was divided into three clusters. The  
139 first was denominated Trifida group which include the isolates from French Guiana, Costa  
140 Rica, Guadalupe and Brazil (Paudalho-PE isolate, GenBank no. KC924404), mainly from  
141 South to Central American countries. This cluster includes YMMV isolates obtained from *D.*  
142 *trifida* host except one *D. alata* isolate (AF548500) from Guadalupe. The second group was  
143 Alata I group consisting of the isolates from Guadalupe, Papua New Guinea and Japan  
144 (Caribbean, Melanesian and Asian countries). This YMMV cluster has *D. alata* origin with  
145 one exception of *D. esculenta* isolate (AF548505) from Guadalupe. The third group was Alata



146 II group and the isolates of this cluster distributed world widely. This group contained South  
147 American isolates from Brazil and Colombia, Caribbean isolate from Martinique and  
148 Guadalupe, Melanesian isolate from Fiji and Papua New Guinea, Asian isolate from Japan  
149 and African isolate from Togo. This cluster also has the *D. alata* host origin, except two  
150 isolates (AF548497 and AF548493) from Martinique. This clustering strongly implies the co-  
151 relationship of viral geno-grouping and host species than geographical factor.

152 The clustering formation according to the host species obtained in this study was also  
153 seen in other potyviral genetic variation studies (Nicolini et al., 2012; Ohshima et al., 2002).  
154 Ohshima et al. (2002) analyzed 76 isolates of *Turnip mosaic virus* (TuMV) based on the coat  
155 protein and P1 genes, and concluded the adaptation of this potyvirus to the host. In another  
156 work, *Cowpea aphid-borne mosaic virus* (CABMV) isolates were collected from cowpea  
157 [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.], passionflower (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg.) and  
158 a native legume plant, *Cassia hoffmannseggii* Mart. from Pernambuco and Rio Grande do  
159 Norte States, Northeastern region of Brazil (Nicolini et al., 2012). The authors found the  
160 clustering in phylogenetic tree based on the original host species rather than the geographical  
161 location. Bousalem et al. (2003) found a possible adaptation of YMMV to *D. trifida*.

162 Our results corroborate with previous works. Viral recombination of yam infecting  
163 potyviruses was also analyzed in this study, however, no positive signals were detected of  
164 YMMV-Paudalho isolate recombination using RDP3 program platform (Martin et al., 2010)  
165 (data not shown).

166  
167

## 168 **Conclusions**

- 169 1. The virus causing mosaic on leaves of *D. trifida* in Pernambuco State was identified as  
170 *Yam mild mosaic virus* (YMMV).
- 171 2. No link was noted between the origin of the isolates and their phylogenetic grouping,  
172 demonstrating possible host adaptation.
- 173 3. The Paudalho-PE isolate of YMMV did not show any positive recombination signals.

174

175 **Acknowledgements**

176 The authors thanks the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico  
177 (CNPq) for the financial support and the (to 1st and 3th doctor fellow´s) and 2nd 5th and 7th  
178 authors were financially supported by CNPq as research fellows.

179

180 **References**

181

182 Andrade, G.P. 2007. Phytosanitary diagnostics of yam culture (*Dioscorea* spp.) in production  
183 areas in the Northeast of Brazil. 75 p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Universidade  
184 Federal Rural de Pernambuco. (In Portuguese, with abstract in English).

185 Andrade, G.P.; Silva, A.K.S.; Filloux, D.; Pio-Ribeiro, G.; Kitajima, E.W.; Xavier, D.M.;  
186 Nascimento, R.J. 2006. YMMV occurrence in *Dioscorea alata* in the State of Pernambuco.  
187 Fitopatologia Brasileira 31 (Supplement): S344 (In Portuguese).

188 Andrade, G.P.; Khalid, M.A.; Xavier, D.M.; Vernier, P.; Pio-Ribeiro, G.; Pedrosa, E.M.R.;  
189 Laranjeira, D.; Melo-Filho, P.A. 2007. Diseases and pests of yam in Pernambuco and  
190 Paraíba and phytosanitary quality of the propagation material. Tropical Plant Pathology 32  
191 (supplement): S 322 (In Portuguese).

192 Asala, S.; Alegbejo, M.D.; Kashina, B.; Banwo, O.O.; Asiedu, R.; Lava-Kumar, P. 2012.  
193 Distribution and incidence of viruses infecting yam (*Dioscorea* spp.) in Nigeria. Global  
194 Journal of Bio-Science & Biotechnology 1: 163-167.

195 Bhandari, M.R.; Kasai, T.; Kawabata, J. 2003. Nutritional evaluation of wild yam (*Dioscorea*  
196 spp.) tubers of Nepal. Food Chemistry 82: 619-623.

197 Bonfield, J.K.; Smith, K.F.; Staden, R. 1995. A new DNA sequence assembly program.  
198 Nucleic Acids Research 23: 4992-4999.

199 Bousalem, M.; Dallot, S.; Fuji, S.; Natsuaki, K.T. 2003. Origin, world-wide dispersion, bio-  
200 geographical diversification, radiation and recombination: an evolutionary history of *Yam*  
201 *mild mosaic virus* (YMMV). Infection, Genetics and Evolution 3: 189-206.

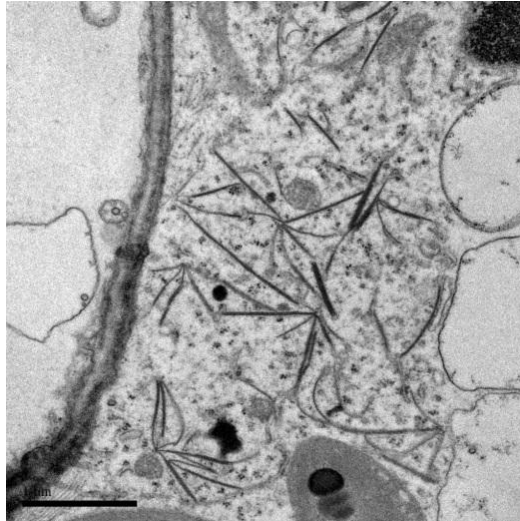
202 Chen, J.; Chen, J.; Adams, M.J. 2001. A universal PCR primer to detect members of the  
203 *Potyviridae* and its use to examine the taxonomic status of several members of the family.  
204 Archives of Virology 146: 757-766.

205 Edwardson, J.R. 1974. Some properties of the *Potato virus Y*-group. Institute of Food and  
206 Agricultural Sciences, University of Florida, Gainesville, FL, USA. (Florida Agricultural  
207 Experiment Stations. Monograph Series, 4).

- 208 Edwardson, J.R.; Christie, R.G. 1978. Use of virus-induced inclusions in classification and  
209 diagnosis. *Annual Review of Phytopathology* 16: 31-55.
- 210 Edwardson, J.R.; Christie, R.G.; Ko, N.J. 1984. Potyvirus cylindrical inclusions—Subdivision-  
211 IV. *Phytopathology* 74: 1111-1114.
- 212 Kenyon, L.; Shoyinka, S.A.; Hughes, J.d'.A.; Odu, B.O. 2001. An overview of viruses  
213 infecting *Dioscorea* yams in Sub-Saharan Africa. p. 432-439. In: Hughes, J.d'.A. and Odu,  
214 B.O., eds. *Plant Virology in Sub-Saharan Africa*. IITA, Ibadan, OYO, NG.
- 215 Loebenstein, G.; Thottappilly, G., eds. 2003. *Virus and Virus-like Diseases of Major Crops in*  
216 *Developing Countries*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, ZH, NL.
- 217 Lucinda, N.; Inoue-Nagata, A.K.; Kitajima, E.W.; Nagata, T. 2010. Complete genome  
218 sequence of *Brugmansia suaveolens mottle virus*, a Potyvirus from an ornamental shrub.  
219 *Archives of Virology* 155: 1729-1732.
- 220 Martin, D.P.; Lemey, P.; Lott, M.; Moulton, V.; Posada, D.; Lefevre, P. 2010. RDP3: a  
221 flexible and fast computer program for analyzing recombination. *Bioinformatics* 26: 2462-  
222 2463.
- 223 Montaldo, A. 1991. Ñames (*Dioscorea* spp. – Dioscoreaceae). p. 91-127. *In: Montaldo, A.*  
224 *Cultivo de Raíces y Tubérculos Tropicales*. 2. ed. rev. Instituto Interamericano de  
225 Cooperación para la Agricultura, San José, SJ, CR. (Instituto Interamericano de  
226 Cooperación para la Agricultura. Libros y Materiales Educativos, 21). (In Spanish).
- 227 Nicolini, C.; Rabelo-Filho, F.A.C.; Resende, R.O.; Andrade, G.P.; Kitajima, E.W.; Pio -  
228 Ribeiro, G.; Nagata, T. 2012. Possible host adaptation as an evolution factor of *Cowpea*  
229 *aphid-borne mosaic virus* deduced by coat protein gene analysis. *Journal of*  
230 *Phytopathology* 160: 82-87.
- 231 Odu, B.O.; Asiedu, R.; Shoyinka, S.A.; Hughes, J.d'.A. 2006. Screening of water yam  
232 (*Dioscorea alata* L.) genotypes for reactions to viruses in Nigeria. *Journal of*  
233 *Phytopathology* 154: 716-724.
- 234 Ohshima, K.; Yamaguchi, Y.; Hirota, R.; Hamamoto, T.; Tomimura, K.; Tan, Z.; Sano, T.;  
235 Azuhata, F.; Walsh, J.A.; Fletcher, J.; Chen, J.; Gera, A.; Gibbs, A. 2002. Molecular

- 236 evolution of *Turnip mosaic virus*: evidence of host adaptation, genetic recombination and  
237 geographical spread. *Journal of General Virology* 83: 1511-1521.
- 238 Pio-Ribeiro, G.; Melo-Filho, P.A.; Kitajima, E.W.; Lima, S.K.; Andrade, G.P.; Domingos,  
239 C.A.; Lima, E.S. 2005. Potyvirus detection in yam plants in commercial fields of  
240 Pernambuco and production of matrizes *in vitro*. *Fitopatologia Brasileira* 30 (Supplement):  
241 S183 (In Portuguese).
- 242 Pio-Ribeiro, G.; Andrade, G.P.; Filoux, D.; Vernier, P.; Melo-Filho, P.A.; Almeida, H.S.M.;  
243 Xavier, A.S. 2006. Yam plants in Pernambuco and Paraíba States show single and mixed  
244 infection by Potyvirus and Badnavirus. *Fitopatologia Brasileira* 31 (Supplement): S309 (In  
245 Portuguese).
- 246 Queiroz, J.V.J.; Pio-Ribeiro, G.; Farias, J.S.; Andrade, G.P.; Araújo, A.L.R. 2009. Ocorrência  
247 of YMV and YMMV in yam (*Dioscorea trifida* L.) in Pernambuco State. *Tropical Plant*  
248 *Pathology* 34 (Supplement): S271 (In Portuguese).
- 249 Santos, E.S. 2002. Sustainable Management of yam culture (*Dioscorea* sp.) in Northeastern of  
250 Brazil. Available at: (<http://www.emepa.org.br/anais/volume1/av112.pdf>) [Accessed Mar.  
251 9, 2012]. (In Portuguese).
- 252 Santos, E.S.; Cazé-Filho, J.; Lacerda, J.T.; Carvalho, R.A. 2007. Yam (*Dioscorea* sp.)  
253 Production technologies and environmental preservation. *Tecnologia & Ciência*  
254 *Agropecuária* 1: 31-36. (In Portuguese).
- 255 Souza, W.; Campos, A.P.C.; Haddad, A.; Sesso, A.; Mandarim-de-Lacerda, C.A.; Míngues,  
256 F.C.; Weissmuller, G.; Rocha, G.M.; Werckmann, J.; Miranda, K.; Medeiros, L.C.S.;  
257 Attias, M.; Farina, M.; Motta, M.C.; Meirelles, M.N.; Silveira, M.; Benchimol, M.;  
258 Monçores, M.C.; Soares, M.J.; Pereira, M.C.S.; Barth, O.M.; Corte-Real, S.; Zorn, T.M.T.;  
259 Souto-Padrón, T.; Lins, U.C.; 1998. Basic Microscopy Techniques Applied to Biological  
260 Sciences. *Sociedade Brasileira de Microscopia e Microanálise*, Rio de Janeiro, RJ, BR. (In  
261 Portuguese)
- 262 Tamura, K.; Peterson, D.; Peterson, N.; Stecher, G.; Nei, M.; Kumar, S. 2011. MEGA5:  
263 Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary

- 264 Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution* 10: 2731-  
265 2739.
- 266 Thouvenel, J.-C.; Fauquet, C. 1986. Yam mosaic virus. Association of Applied Biologists,  
267 Wellesbourne, WAR, UK. (Association of Applied Biologists. AAB Descriptions of Plant  
268 Viruses, 314).
- 269 Wanasundera, J.P.D.; Ravindran, G. 1994. Nutritional assessment of yam (*Dioscorea alata*)  
270 tubers. *Plant Foods for Human Nutrition* 46: 33-39.
- 271
- 272

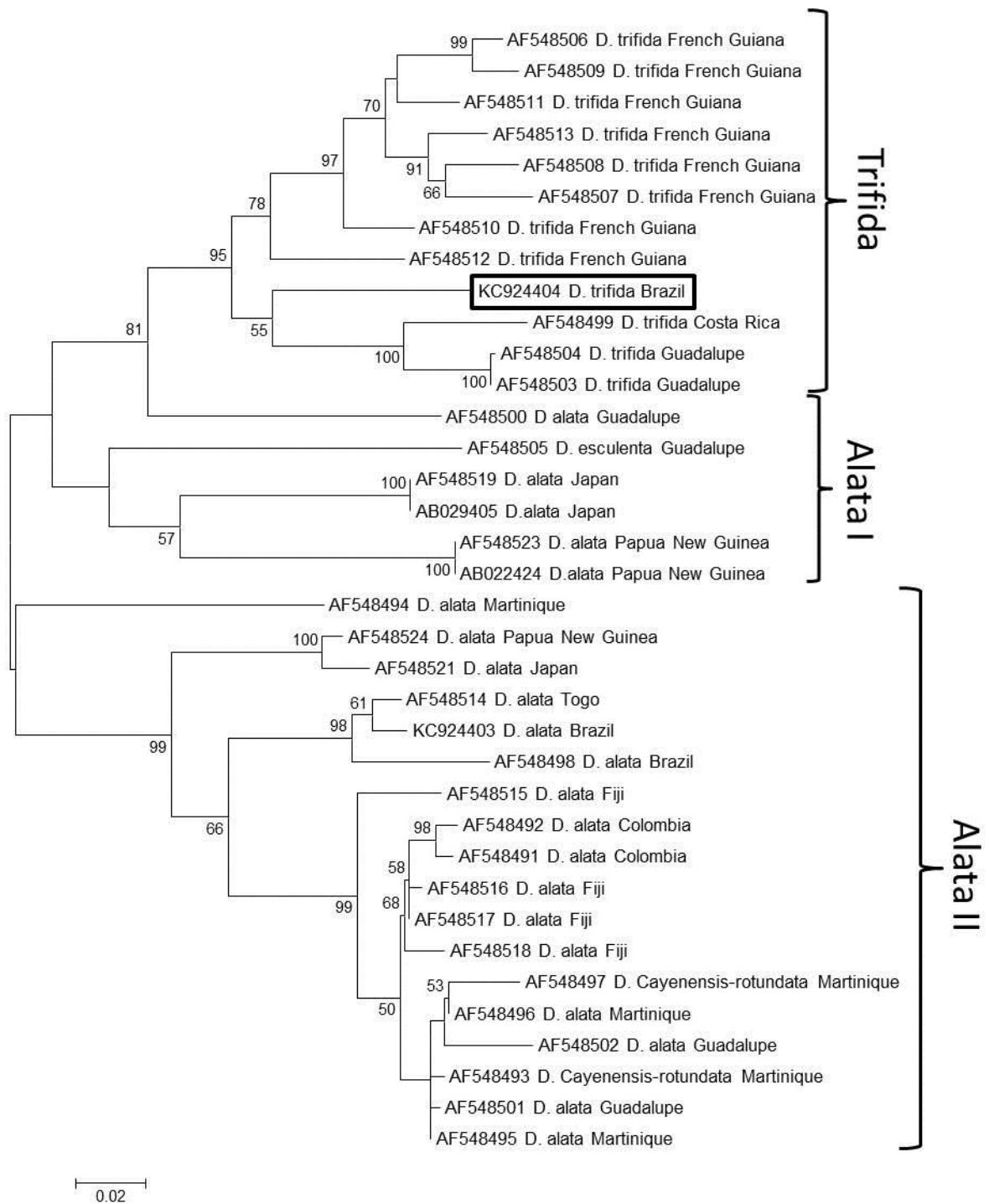


273

274

275 **Figure 1.** Transmission electron micrograph of thin section of a parenchymal cell of *Dioscorea*  
276 *trifida* leaf, infected with *Yam mild mosaic virus* (YMMV). Note the laminated cytoplasmic inclusions  
277 of type II in the classification of Edwardson (1974). This cytological effect of YMMV infection is  
278 essentially similar to that caused by *Yam mosaic virus* (YMV) (Thouvenal and Fauquet, 1986).

279



280

281

282 **Figure 2.** Phylogenetic tree constructed based on the nucleotide sequence of *cp* gene of the  
 283 Paudalho-PE isolate of *Yam mild mosaic virus* (YMMV) from *Dioscorea trifida* and YMMV  
 284 sequences available in the GenBank. The isolate was indicated with box. The tree was  
 285 constructed by Maximum likelihood method with 1000 repetitions. The bootstrap values  
 286 above 50 shown in the figure.



## CAPÍTULO IV

---

---

**Cloning and expression of capsid protein by *Escherichia coli* from a Brazilian isolate of *Yam mild mosaic virus* and polyclonal antibody production**

1 **CAPÍTULO IV Cloning and expression of capsid protein by *Escherichia coli* from a**  
2 **Brazilian isolate of *Yam mild mosaic virus* and polyclonal antibody production**

3 Francisco de Assis Câmara Rabelo-Filho<sup>1</sup>; Daniel Mendes Pereira Ardisson-Araújo<sup>2</sup>,  
4 Franciele Roberta Maldaner<sup>2</sup>, Fabrício da Silva Morgado<sup>2</sup>, Genira Pereira de Andrade<sup>1</sup>,  
5 Gilvan Pio-Ribeiro<sup>1</sup>, Renato de Oliveira Resende<sup>2</sup>, Bergmann Moraes Ribeiro<sup>2</sup>, Tatsuya  
6 Nagata<sup>2</sup>

7 <sup>1</sup> Departamento de Agronomia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, 52171-900,  
8 Recife-PE, Brazil; <sup>2</sup> Departamento de Biologia Celular, Universidade de Brasília, 70910-900,  
9 Brasília-DF, Brazil

10

11 Author for correspondence: Tatsuya Nagata, e-mail: tatsuya@unb.br

12

13

14

15

16 **ABSTRACT**

17 Polyclonal antiserum against *Yam mild mosaic virus* (YMMV) was produced using the coat  
18 protein (CP) of a Brazilian YMMV isolate expressed in *Escherichia coli*. The *cp* gene of the  
19 virus was amplified by RT followed by PCR using degenerate primers to the genus *Potyvirus*.  
20 The fragment was cloned in pGEM-T Easy vector and sequenced to confirm their identity.  
21 The complete *cp* gene was subcloned into pDONR207 vector, after then, in the pDEST17  
22 expression vector. *Escherichia coli* BL21-AI was transformed with the construct and the CP  
23 was expressed with the arabinose inducer. The CP was purified by Ni-NTA affinity column  
24 and analyzed by SDS-PAGE and Western Blotting. Two rabbits were immunized with the  
25 purified protein. The antisera from the two rabbits were collected at three different time and  
26 evaluated by Dot - Enzyme-linked immunosorbent assay (Dot-ELISA). Results of this test  
27 showed that the antisera reacted well regardless of the time of collection and the rabbit  
28 evaluated. IgG was purified from antiserum and conjugated with alkaline phosphatase for  
29 Double antibody sandwich - Enzyme-linked immunosorbent assay (DAS-ELISA) test. The

30 procedure differentiated positive sample ( $OD_{405} = 1.489$ ) from the negative control ( $OD_{405} =$   
31 0.429). These results showed that this antibody can be used for the diagnosis of YMMV  
32 infection on ELISA.

33 **Keywords:** DAS-ELISA, detection, Dot-ELISA, yam, YMMV.

34

## 35 **RESUMO**

36 Antissoro policlonal para *Yam mild mosaic virus* (YMMV) foi produzido usando-se a capa  
37 proteica (CP) de um isolado brasileiro de YMMV expresso em *Escherichia coli*. O gene *cp* do  
38 vírus foi amplificado por RT seguida de uma PCR utilizando *primers* degenerados para o  
39 gênero *Potyvirus*. O Fragmento foi clonado no vetor pGEM-T Easy, e sequenciado para a  
40 confirmação de sua identidade. O gene *cp* completo foi subclonado no plasmídeo pDONR207  
41 e, em seguida, no vetor de expressão pDEST17. *Escherichia coli* BL21-AI foi transformada  
42 com a construção e a CP foi expressa usando o indutor arabinose. A CP foi purificada por  
43 colunas de afinidade Ni-NTA e analisada por SDS-PAGE e Western Blotting. Dois coelhos  
44 foram imunizados com a proteína purificada. Os antissoros dos dois coelhos foram coletados  
45 em três diferentes épocas e avaliados por *Dot - Enzyme-linked immunosorbent assay* (Dot-  
46 ELISA). Resultados desse teste mostraram que os antissoros reagiram bem independentes da  
47 época de coleta e do coelho avaliado. IgG foi purificada a partir do antissoro e conjugada a  
48 fosfatase alcalina para o teste *Double antibody sandwich Enzyme-linked immunosorbent assay*  
49 (DAS-ELISA). O procedimento foi capaz de diferenciar amostra positiva ( $OD_{405} = 1.489$ ) do  
50 controle negativo ( $OD_{405} = 0.429$ ). Estes resultados mostram que o antissoro obtido pode ser  
51 usado na diagnose da infecção de YMMV por meio de ELISA.

52 **Palavras-chaves:** DAS-ELISA, detecção, Dot-ELISA, inhame, YMMV.

53

## 54 **1. Introduction**

55 The yam (*Dioscorea* spp.) is a crop that has a great social importance, generating  
56 employment and income in rural areas in Brazil. Furthermore, in developing countries it plays  
57 an important role as nutrients and vitamins supply.

58 There are many diseases that can reduce yam yield caused mainly by fungi, viruses and  
59 nematodes. Viruses from different genera are reported as important pathogens of yam being

60 relevant *Yam mosaic virus* (YMV) and *Yam mild mosaic virus* (YMMV) of the genus  
61 *Potyvirus* (Mumford & Seal, 1997; Kenyon et al., 2001; Amusa et al., 2003; Andrade, 2007;  
62 Queiroz et al., 2009). The viruses from the genus *Potyvirus* possess a positive sense ssRNA  
63 genome of ~ 10 K nt and are transmitted by species of aphid (Fauquet et al., 2005; López-  
64 Moya & García, 2008). YMMV was first reported as Yam virus 1 (YV1) (Hughes, 1986) and  
65 later as *Dioscorea alata virus* (DAV) (Odu et al., 1999) but only recently the complete genome  
66 was sequenced (Rabelo-Filho et al., 2013).

67 The correct identification of plant viruses is important to establish strategies for its control  
68 (Rabelo-Filho et al., 2005). Serological methods are commonly used strategy for diagnostics  
69 of plant viruses, including the *Potyvirus* genus (Shukla et al., 1994; Hull, 2002, Rabelo-Filho  
70 et al., 2005; López-Moya & García, 2008; Lima et al., 2012). However, there is a limitation to  
71 the use of serological techniques in the diagnosis of plant viruses when it is the difficult to  
72 obtain specific virus antiserum (Rabelo-Filho et al., 2005; Lima et al., 2012). This is the case  
73 of the viruses that naturally infect yam since the transmission to other hosts is not easy and  
74 yam plants have high contents of polysaccharides.

75 In the first report of virus in yam in Brazil, Ávila et al. (1982) mentioned difficulties in  
76 characterization of a potyvirus isolate, due to failure in mechanical and vector transmission,  
77 obtaining only a partial characterization by electron microscopy. An attempt of virus  
78 purification using yam leaves was not successful, due to the high viscosity and rapid  
79 oxidation of macerated tissue of yam plants.

80 The use of viral antigen expression in heterologous system provides an useful tool for  
81 antiserum production in case the virus particle purification is difficult and when wants to  
82 obtain a highly specific antiserum with no cross reaction. In many cases, the coat protein of  
83 viruses is the target to express usually by their immunogenic properties (Barbieri et al., 2004).  
84 The objective of the present study was the production of specific antiserum to YMMV by the  
85 expression of the CP of an YMMV isolate using *Escherichia coli* BL21-AI strain and evaluate  
86 the antibody by Dot - Enzyme-linked immunosorbent assay (Dot-ELISA) and Double  
87 antibody sandwich - Enzyme-linked immunosorbent assay (DAS-ELISA).

88

## 89 2. Materials and Methods

### 90 2.1 Acquisition and cloning of the YMMV coat protein gene

91 Total RNA was extracted from an infected yam plant previously indexed to YMMV.  
 92 Plant RNA Reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) was used for total RNA extraction  
 93 according to the manufacturer's instructions. The first cDNA strand was synthesized using a  
 94 primer oligo(dT)<sub>50</sub>PaclM4 (5'-TCA GCA CTG ACC CTT TTG AAT TAA T<sub>50</sub>-3'). PCR was  
 95 performed using the anchor primer M4 (5'-TCA GCA CTG ACC CTT TTG-3') and PY11  
 96 primer (5'-GGN AAY AAY AGY GGN CAR CC-3') (Rabelo-Filho et al., 2013).

97 The presence of the amplified cDNA was confirmed by agarose gel electrophoresis  
 98 and cDNA fragments were purified using Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification  
 99 Kit (GE Healthcare, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK). The purified cDNA was ligated  
 100 with pGEM-T Easy vector (Promega, Madison, WI, USA) at 8 °C overnight, and then  
 101 transferred to *E. coli* DH5α cells (Invitrogen) by electroporation. The transformed cells were  
 102 incubated in 900 uL of SOC medium (Sambrook et al., 1989) with agitation of 220 rpm at 37  
 103 °C on a shaker. Then, the bacteria were plated on Luria-Bertani (LB) medium with agar  
 104 (1.5%) containing ampicillin (100 µg mL<sup>-1</sup>), X-gal (20 µg mL<sup>-1</sup>) and IPTG (40 µg mL<sup>-1</sup>) and  
 105 the plates were incubated at 37 °C overnight. On the following day, 10 white colonies were  
 106 selected and grown in liquid LB medium and incubated at 37 °C for approximately 16 h with  
 107 agitation. The plasmid DNA extraction was performed using Illustra Plasmid Prep Mini Spin  
 108 Kit (GE Healthcare).

109 The purified plasmids digested by the restriction enzyme EcoR1 (New England  
 110 Biolabs, Ipswich, MA, USA) for screening and selected clones were sequenced at Macrogen  
 111 (Seoul, South Korea) using the 3730 XL automated sequencer (Applied Biosystems, Foster  
 112 City, CA, USA). The obtained sequences were analyzed using the Staden package program  
 113 (Bonfield et al., 1995) and the identities of the nucleotide sequences were confirmed by  
 114 BlastN (Altschul et al., 1990). After confirming the coat protein gene (*cp* gene), a pair of  
 115 specific primers for CP expression containing attB sites was designed for subsequent gene  
 116 transfer to the entry vector pDONR207 (Invitrogen). They were AttB1-YMMVFNEW (5'-  
 117 GGG GAC AAG TTT GTA CAA AAA AGC AGG CTT CGC AAG CAA AGA ACA AAT  
 118 ACT TGA TG-3') and AttB2-YMMVFNEW (5'-GGG GAC CAC TTT GTA CAA GAA  
 119 AGC TGG GTC CTA GAT GTT ACG CAC CCC AAG GAG A-3').

120

## 121 **2.2 Cloning the *cp* gene into the entry vector**

122 The cloning of amplified cDNA of *cp* gene to pDONR207 was performed by the  
123 recombination using BP Clonase (Invitrogen). The reaction mixture was prepared as: 1  $\mu$ L of  
124 cDNA of *cp* gene (100 ng), 1  $\mu$ L of the entry vector pDONR207 (150 ng), 6  $\mu$ L of TE buffer  
125 (pH 8.0) and 2  $\mu$ L of BP Clonase (final volume of 10  $\mu$ L). Thereafter, the reaction mix was  
126 incubated overnight at room temperature, around 22 °C. Proteinase K in the kit was added in  
127 the solution and incubated for 10 min in the incubator at 37 °C. Subsequently, chemically  
128 competent *E. coli* DH5 $\alpha$  cells were transformed according to manufacturer's  
129 recommendations. The obtained construction pDONR207-YMMVcp was digested with PstI  
130 and XbaI for the confirmation of the insertion of the gene in the vector. The selected clones  
131 were sequenced for the confirmation of the gene.

132

## 133 **2.3 Cloning of *cp* gene into the expression vector**

134 YMMVcp gene was transferred to an expression vector pDEST17 using LR Clonase  
135 (Invitrogen) following the manufacturer's instructions. Then, the transformation was  
136 performed to *E. coli* DH5 $\alpha$  cells, as previously described. The selected clones were submitted  
137 for the digestion with the NdeI (Fermentas, Vilnius, Lithuania) and the electrophoretic pattern  
138 was analyzed. Four clones were sequenced (pDEST17-YMMVcp) and transferred to a *E. coli*  
139 BL21-AI strain (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) for protein expression.

140

## 141 **2.4 Expression, purification and quantitation of recombinant proteins**

142 Bacterial growth was done using liquid LB medium plus ampicillin (100  $\mu$ g.mL<sup>-1</sup>) till  
143 the OD<sub>600</sub> = 0.4. The induction was done adding arabinose at final concentration of 0.2% for 3  
144 h at 37 °C with agitation. The protein was purified using His-tag affinity column (Invitrogen)  
145 according to the instruction of the manufacture as insoluble protein. The purified protein was  
146 analyzed by SDS PAGE and Western Blotting using antibody against His-Tag which was  
147 added to the YMMV CP in the N-terminal by pDEST17. The purified proteins were dialyzed  
148 with 0.5X PBS pH 6.5 and quantified using Nanodrop 3300 (Thermo Scientific, Waltham,  
149 MA, USA).

150

## 151 **2.5 Immunization of rabbits for antiserum production against recombinant protein**

152 For production of polyclonal antiserum against CP of YMMV, two female rabbits of  
153 about three months old were immunized. The immunization was done by injection of 200 µg  
154 of purified CP in a volume of 1 mL emulsified with an equal volume of Freund's complete  
155 adjuvant as first injection and two following boost injections using the Freund's incomplete  
156 adjuvant with three-week intervals. After the last injection, three blood collections to a  
157 volume of approximately 10 mL were done weekly and the antisera were stored at freezer -20  
158 °C.

159

## 160 **2.6 Dot-ELISA**

161 The Dot-ELISA test (ALMEIDA & LIMA, 2001) was performed to evaluate the  
162 profile of antisera from the two rabbits assessed, collected at three different times. The  
163 negative and positive controls were diluted (1:10, 1:100) in buffer PBS 1X pH 7.0. The  
164 primary antibody was collected from rabbits which were diluted (1:3000) in PBS 1X pH 7.0  
165 with 4% non-fat dry milk. The dotted membrane was incubated with antisera for 2 h, then  
166 washed with 1X PBS pH 7.0 + 0.1% Tween 20. The secondary antibody (goat anti-rabbit)  
167 conjugated with alkaline phosphatase was added (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)  
168 (1:3000) and incubated for 1 h. The positive reactions were evaluated by adding freshly  
169 prepared substrate: 33 µl and 66 µl of 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate (BCIP) and  
170 nitroblue tetrazolium (NBT), respectively in 10 mL of alkaline buffer.

171

## 172 **2.7 IgG purification and antibody conjugation to enzyme alkaline phosphatase**

173 For the antibody purification, the antiserum was diluted in distilled water (1:10) and  
174 equal volume of saturated ammonium sulfate was added slowly, then incubated at 8 °C for 4  
175 h. The solution was centrifuged at 4.000 rpm for 20 min at 4 °C. After discarding the  
176 supernatant, the pellet was resuspended in 0.5X PBS pH 6.5. Then it was subjected to dialysis  
177 in the same buffer for a total of three buffer exchanges, with 2 h interval in each change at 4  
178 °C. It was subjected to a column of DEAE-Sephacel (GE Healthcare). The fractions of 1mL  
179 each were collected and their OD was measured at 280 nm. The fraction with higher OD<sub>280</sub>  
180 was kept at -20°C

181 The concentration of the selected fraction was adjusted as 1 mg/mL with 0.5X PBS  
182 buffer pH 7.2 and then 1 mL of this purified antibody was added in the tube with alkaline  
183 phosphatase enzyme (Sigma-Aldrich), previously centrifuged and precipitated (80  $\mu$ L).  
184 Thereafter, the mixture was transferred to a dialysis tube and the ends of the tube were sealed.  
185 The tube was immersed in 100 mL of 0.5X PBS buffer adding 200  $\mu$ L of 25% glutaraldehyde  
186 and stirring for 4 h at room temperature avoiding light. Dialysis was carried out three times  
187 for 2 h in the buffer in a volume of 1 L to remove excess of glutaraldehyde. After dialysis, a  
188 small amount of sodium azide was added and the conjugated antibody was stored at 4° C with  
189 diluted in glycerol (1:1).

190

### 191 **2.8 DAS-ELISA using controls and leaf samples**

192 The purified antibody previously diluted in carbonate buffer (1  $\mu$ g/ml) was added in each  
193 well of the ELISA plate with volume of 150  $\mu$ L, which was incubated for 2 h in an incubator  
194 at 37 °C. After three times of washing the well with 1X PBS-Tween 20 (0,05%), 120  $\mu$ L of  
195 diluted sample concentrations (1:20, 1:40, 1:80) were applied to the wells and incubated for 2  
196 h at 37 °C. The plate was washed again with PBS-T, and the anti-CP conjugated (1:500) with  
197 alkaline phosphatase were added in the wells and incubated for 2 h at 37 °C. After this step,  
198 the substrate (p-nitrophenylphosphate) final concentration 1mg/mL was added and incubated  
199 at room temperature. The absorbance was measured with 20 min intervals.

200

## 201 **3. Results**

202 The cp gene cloned into entry vector pDONR207 was confirmed by sequencing. Clones  
203 from entry vector pDONR207 were recombined by LR Clonase reaction to pDEST17  
204 expression vector and *E. coli* DH5 $\alpha$  strain was transformed. Plasmids were purified by  
205 miniprep and BL21-AI expression bacterial strain was transformed. Eight clones were  
206 recovered from plates and submitted to protein expression assay as described above.

207 Western Blotting assay was performed using anti-His Tag antiserum to confirm protein  
208 expression. Seven clones showed the expression patterns as expected to the CP protein size  
209 (Figure 1A). The solubility test of the CP protein was performed by SDS-PAGE to determine



210 the purification protocol. The CP protein was confirmed in the insoluble fraction (Figure 1B),  
211 and the purification procedure was performed in denaturant condition.

212 The YMMV CP expression was performed in middle scale for protein purification with a  
213 final volume of 400 mL LB medium. The protein purification was confirmed by SDS-PAGE  
214 and Western Blotting assay (Figure 2A and Figure 2B), showing a thick band of  
215 approximately 32 kDa with the insoluble fraction, which corresponds to the YMMV CP  
216 molecular mass.

217 The antisera from two rabbits were evaluated by Dot-ELISA and showed strong signal  
218 and specificity (data not shown), differentiating the positive from the negative control. Based  
219 on Dot-ELISA results the serum from Rabbit 2 Bled 2 was chosen for antibody purification  
220 and conjugation with alkaline phosphatase. The DAS-ELISA was performed using this  
221 antibody and its conjugate. The result showed the positive sample absorbance values ( $OD_{405}$   
222 = 1.489) three times higher than those of the negative controls ( $OD_{405}$  = 0.429). This result  
223 indicated that this protocol can be useful for routine diagnostics for YMMV infection.

#### 224 **4. Discussion**

225 As observed in this study, the expression system using prokaryotic system (bacteria) can  
226 be efficient in the expression of viral proteins such as coat protein (CP) (Barbieri et al., 2004;  
227 Iracheta-Cárdenas et al., 2008; Gulati-Sakhuja et al., 2009; Singh et al., 2011; Carvalho et al.,  
228 2013). Other genes, as movement protein (MP) *mp* gene, can be expressed to produce antisera  
229 (Rubinson et al., 1997; Calegario et al., 2012). However, protein expressed in *E. coli*, does not  
230 usually have the natural conformation form, and for this reason usually antibody developed  
231 against these proteins have high risks of not-working in ELISA. Approximately  $\frac{3}{4}$  of antisera  
232 produced by this manner do not work by ELISA (Dr. René van der Vlugt, Wageningen  
233 University/Research - personal communication). The factor that influences this difference is  
234 still not well-characterized.

235 According Rubinson et al. (1997), the movement protein (MP) in some case, can be more  
236 efficient target for viral detection using ELISA format when compared to CP. In the case of  
237 *Grapevine virus A* (GVA), the MP may be more stable indicator than CP, due to the CP  
238 concentration decrease when the virus titer decreased.

239 **5. References**

240

241 Almeida AMR (2001) Detecção e quantificação de vírus pelo teste de ELISA. In:  
242 Almeida AMR, Lima JAA (Eds.) Princípios e Técnicas de diagnose aplicados em  
243 Fitovirologia. Brasília BR. Gráfica Nacional. pp. 63-94.

244

245 Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ (1990) Basic local alignment  
246 search tool. Journal of Molecular Biology 215:403-410.

247

248 Amusa NA, Adegbite AA, Muhammed S, Baiyewu RA (2003) Yam diseases and its  
249 management in Nigeria. African Journal of Biotechnology 2:497-502.

250

251 Andrade GP (2007) Diagnóstico fitossanitário da cultura do inhame (*Dioscorea* spp.)  
252 em áreas produtoras do Nordeste do Brasil. D. Sc. Thesis, Universidade Federal Rural  
253 de Pernambuco. Recife PE, BR.

254

255 Ávila AC, Gama MICS, Kitajima EW (1982) Detecção de um potyvirus em inhame  
256 (*Dioscorea* sp.) no Brasil. Fitopatologia Brasileira 7:447-452.

257

258 Barbieri MR, Carvalho MG, Zambolim EM, Zerbini FM (2004) Expressão em  
259 *Escherichia coli* da proteína capsidial do *Watermelon mosaic virus* e produção de anti-  
260 soro. Fitopatologia Brasileira 29:215-219.

261

262 Bonfield JK, Smith KF, Staden R (1995) A new DNA sequence assembly program.  
263 Nucleic Acids Research 23:4992-4999.

264

265 Calegario RF, Labate MTV, Peroni LA, Stach-Machado DR, Andrade MO, Freitas-  
266 Astúa J, Labate CA, Machado MA, Kitajima EW (2012) *In vitro* expression and  
267 antiserum production against the movement protein of *Citrus leprosis virus C* (CiLV-  
268 C). Tropical Plant Pathology 37:136-141.

269

- 270 Carvalho SL, Silva FN, Zanardo LG, Almeida AMR, Zerbini FM, Carvalho CM  
271 (2013) Production of polyclonal antiserum against *Cowpea mild mottle virus* coat  
272 protein and its application in virus detection. *Tropical Plant Pathology* 38:49-54.  
273
- 274 Fauquet CM, Mayo MA, Maniloff J, Desselberger U, Ball LA (2005) *Virus*  
275 *Taxonomy*. Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses.  
276 8<sup>th</sup> Ed. San Diego USA. Elsevier Academic Press.  
277
- 278 Gulati-Sakhuja A, Sears JL, Nuñez A, Liu HY (2009) Production of polyclonal  
279 antibodies against *Pelargonium zonate spot virus* coat protein expressed in  
280 *Escherichia coli* and application for immunodiagnosis. *Journal of Virological Methods*  
281 160:29-37.  
282
- 283 Hughes, Jd'A (1986) *Viruses of the Araceae and Dioscorea species: their isolation*  
284 *characterization and detection*. Ph. D. Thesis, University of Reading. Reading BK,  
285 UK.  
286
- 287 Hull R (2002) *Matthews' Plant Virology*. 4<sup>th</sup> Ed. London UK. Academic Press.  
288
- 289 Iracheta-Cárdenas M, Sandoval-Alejos BD, Román-Calderón ME, Manjunath KL, Lee  
290 RF, Rocha-Penã MA (2008) Production of polyclonal antibodies to the recombinant  
291 coat protein of *Citrus tristeza virus* and their effectiveness for virus detection. *Journal*  
292 *of Phytopathology* 156:243-250.  
293
- 294 Kenyon L, Shoyinka SA, Hughes Jd'A, Odu BO (2001) An overview of viruses  
295 infecting *Dioscorea* yams in sub-Saharan Africa. Hughes, Jd'A, Odu BO (Eds.). *Plant*  
296 *virology in sub-Saharan Africa (Proceedings...)*. Ibadan NGA. International Institute  
297 of Tropical Agriculture. pp. 432-439.  
298
- 299 Lima JAA, Nascimento AKQ, Radaelli P, Purcifull DE (2012) Serology applied to  
300 plant virology. In: Moslih A-M (Org.) *Serological diagnosis of certain human, animal*  
301 *and plant diseases*. Rijeka HRV. In Tech. pp. 71-94.  
302

- 303 López-Moya JJ, García JA (2008) Potyviruses. In: Mahy BWJ, van Regenmortel  
304 MHV (Eds.) Encyclopedia of virology. Oxford UK. Elsevier. pp. 313-322.  
305
- 306 Mumford RA, Seal SE (1997) Rapid single-tube immunocapture RT-PCR for the  
307 detection of two yam potyviruses. Journal of Virological Methods 69:73-79.  
308
- 309 Odu BO, Hughes Jd'A, Shoyinka SA, Dongo LN (1999) Isolation, characterization  
310 and identification of a potyvirus from *Dioscorea alata* L. (water yam) in Nigeria.  
311 Annals of Applied Biology 134:65-71.  
312
- 313 Queiroz JVJ, Pio-Ribeiro G, Farias JS, Andrade GP, Araújo ALR (2009) Ocorrência  
314 de YMV e YMMV em inhame (*Dioscorea trifida*) em Pernambuco. In: 42º Congresso  
315 Brasileiro de Fitopatologia, Resumos... Rio de Janeiro RJ. SBF. p.271.  
316
- 317 Rabelo-Filho FAC, Lima JAA, Ramos NF, Gonçalves MFB, Carvalho KF (2005)  
318 Produção de anti-soro para o vírus do mosaico da abóbora mediante imunização oral  
319 de coelhos. Ciência Agronômica 36:344-347.  
320
- 321 Rabelo-Filho FAC, Nicolini C, Resende RO, Andrade GP, Pio-Ribeiro G, Nagata T  
322 (2013) The complete genome sequence of a Brazilian isolate of *Yam mild mosaic*  
323 *virus*. Archives of Virology 158:515-518.  
324
- 325 Rubinson E, Galiakparov N, Radian S, Sela I, Tanne E, Gafny R (1997) Serological  
326 detection of *Grapevine virus A* using antiserum to a nonstructural protein, the putative  
327 movement protein. Phytopathology 87:1041-1045.  
328
- 329 Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) Molecular cloning: a laboratory manual.  
330 2<sup>nd</sup>. Ed. New York USA. Cold Spring Harbor Laboratory Press.  
331
- 332 Shukla DD, Ward CW, Brunt AA (1994) The Potyviridae. Wallingford UK. CAB  
333 International.  
334

335 Singh L, Hallan V, Ram R, Zaidi AA (2011) Expression of recombinant  
336 *Chrysanthemum virus B* coat protein for raising polyclonal antisera. Journal of Plant  
337 Biochemistry and Biotechnology 20:96-101.

338

339 Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S (2011) MEGA5:  
340 Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary  
341 Distance, and Maximum Parsimony Methods. Molecular Biology and Evolution  
342 28:2731-2739.

343

344

345

346

347

348

349

350

351

352

353 **A** L T0 1 2 3 4 5 6 7 8

354

355 **B** L 2I 2S 5I 5S

356

357

358 **Figure 1:** Western Blotting with a commercial antibody against the histidine tail (Santa Cruz  
359 Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), demonstrating the expression of *Escherichia coli*  
360 BL21-AI clones and solubility test by SDS-PAGE of the two selected clones. **Figure A:** L-  
361 Ladder; T0- 0 hours; 1- clone 1; 2- clone 2; 3- clone 3; 4- clone 4; 5- clone 5; 6- clone 6; 7-  
362 clone 7; 8- clone 8. **Figure B:** L- Ladder; 2I- clone 2 insoluble fraction; 2S- clone 2 soluble  
363 fraction; 5I- clone 5 insoluble fraction; and 5S- clone 5 soluble fraction.

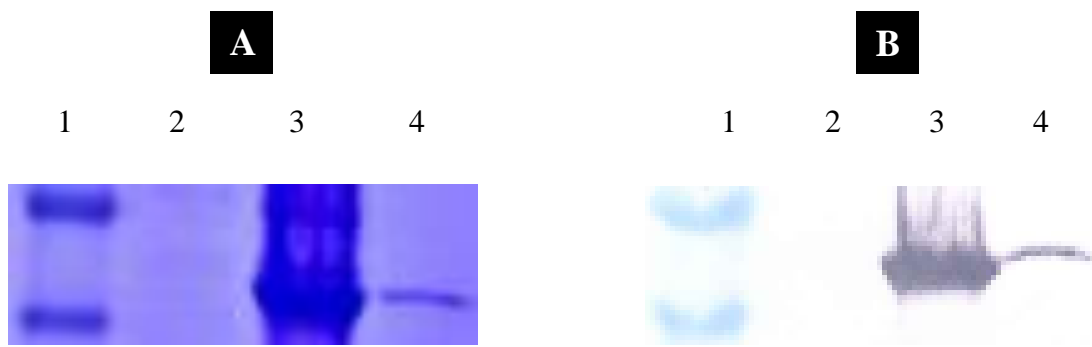
364

365

366

367

368



369 **Figure 2:** Analyses of *Yam mild mosaic virus* coating protein purified by affinity  
370 chromatography with nickel columns (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). A- SDS-PAGE; B-  
371 Western Blotting with commercial antibody against the histidine tail (Santa Cruz  
372 Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA). 1- Ladder; 2- Not induced bacteria; 3. Induced  
373 bacteria; 4. Purified protein.

374

375

376

377

378

379

380

381

## **CONCLUSÕES GERAIS**





1. O vírus que estava causando mosaico em *D. trifida*, foi identificado como YMMV;
2. Foi verificado na filogenia baseado das sequencias nucleotídicas de *cp*, que isolados de *Yam mild mosaic virus* (YMMV) se agrupam de acordo com o hospedeiro ao qual o isolado viral foi coletado, implicando assim adaptação ao hospedeiro nessa espécie viral;
3. Não foi observado sinais de recombinação gênica quando analisada a capa protéica de um isolado de YMMV, nem quando analisada o genoma completo deste vírus;
4. O antissoro produzido contra YMMV, proveniente de coelhos imunizados com a capa protéica expressa em bactéria, pode ser usado no diagnóstico de YMMV em inhame.