

Incidência e caracterização molecular de badnavírus em bancos de germoplasma de inhame no Brasil

Jean Phellipe Marques do Nascimento¹; Mayara Oliveira de Lima¹; Georgia de Souza Peixinho¹; Mayra Machado de Medeiros Ferro¹; Sarah Jacqueline Cavalcanti da Silva¹; Elizabeth Ann Veasey²; Gaus Silvestre de Andrade Lima¹; Iraildes Pereira Assunção¹

¹Setor de Fitossanidade/Campus de Engenharias e Ciências Agrárias, Universidade Federal de Alagoas, CEP 57100-000, Rio Largo, AL-Brasil.

²Departamento de Genética, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo (ESALQ-USP), CEP 13418-900, Piracicaba, SP - Brasil

Autor para correspondência: Mayara Oliveira de Lima (mayaralima1811@gmail.com)

Data de chegada: 04/07/2018. Aceito para publicação em: 19/12/2019.

10.1590/0100-5405/206682

RESUMO

Nascimento J.P.M.; Lima M.O.; Peixinho G.S.; Ferro M.M.M.; Silva S.J.C.; Veasey E.A.; Lima G.S.A.; Assunção, I.P. Incidência e caracterização molecular de badnavírus em bancos de germoplasma de inhame no Brasil. *Summa Phytopathologica*, v.46, n.3, p.242-249, 2020.

Os badnavírus (família *Caulimoviridae*) possuem genoma de dsDNA semicircular encapsulado em partículas baciliformes. *Dioscorea bacilliform virus* (DBV) é um importante *Badnavirus* infectando várias espécies de *Dioscorea* (inhame) no hemisfério sul. No presente estudo, 235 amostras foliares de inhame foram coletadas em diferentes bancos de germoplasma mantidos pela Escola Superior de Agricultura Luiz (ESALQ/USP), Universidade Federal de Viçosa (UFV) e Universidade Federal do Recôncavo Baiano (UFRB). A incidência média de badnavírus nas amostras avaliadas foi de 75,3%. As análises moleculares e filogenéticas, realizadas a partir de 42 sequências nucleotídicas, da região da RT/RNaseH de badnavírus, revelaram a ocorrência do *Dioscorea*

bacilliform AL virus (DBALV) e *Dioscorea bacilliform SN virus* (DBSNV) em diferentes espécies de inhame. Até o momento, somente o DBALV havia sido relatado em inhame no Brasil, estando restrito à região Nordeste. Portanto, este é o primeiro relato do DBSNV infectando a cultura do inhame, no país. Além das espécies espissomais, também foram detectadas sequências endógenas, com porcentagem de identidade de nucleotídeos variando entre 89% e 100% com endogenous *Dioscorea bacilliform virus* (eDBV), pertencentes aos grupos 9 e 12. Os resultados obtidos corroboram com a hipótese de que o DBALV e o DBSNV estão presentes em materiais propagativos de inhame e amplamente disseminados no Brasil.

Palavras-chave: *Dioscorea* spp., *Caulimoviridae*, sequências endógenas.

ABSTRACT

Nascimento J.P.M.; Lima M.O.; Peixinho G.S.; Ferro M.M.M.; Silva S.J.C.; Veasey E.A.; Lima G.S.A.; Assunção, I.P. Incidence and molecular characterization of badnavirus in germplasm banks of yam in Brazil. *Summa Phytopathologica*, v.46, n.3, p.242-249, 2020.

Badnaviruses (family *Caulimoviridae*) have semicircular dsDNA genomes encapsulated into bacilliform particles. *Dioscorea bacilliform virus* (DBV) is an important *Badnavirus* infecting several species of *Dioscorea* (yam) in the southern hemisphere. In this study, 235 yam leaf samples were collected from different germplasm banks maintained by “Luiz de Queiroz” College of Agriculture (ESALQ/USP), Federal University of Viçosa (UFV) and Federal University of Recôncavo da Bahia (UFRB). The average incidence of badnavirus in the evaluated samples was 75.3%. Molecular and phylogenetic analyses, carried out from 42 nucleotide sequences, of the badnavirus RT/RNaseH

region, revealed the occurrence of *Dioscorea bacilliform AL virus* (DBALV) and *Dioscorea bacilliform SN virus* (DBSNV) in different yam species. So far, only DBALV has been reported in yams in Brazil, being restricted to the Northeast region. Therefore, this is the first report of DBSNV infecting yam crop in the country. In addition to the episomal species, endogenous sequences were detected, and the percentage of nucleotide identity varied between 89% and 100% with endogenous *Dioscorea bacilliform virus* (eDBV), belonging to groups 9 and 12. The obtained results corroborate the hypothesis that DBALV and DBSNV are present in yam propagating materials and are widely disseminated in Brazil.

Keywords: *Dioscorea* spp., *Caulimoviridae*; endogenous sequences

O inhame (*Dioscorea* spp.) é suscetível a diversas doenças nas fases de pré e pós-colheita que comprometem a sua produção, armazenamento e exportação (1).

As viroses são de particular importância, uma vez que a produção de mudas é realizada por propagação vegetativa utilizando de pequenas túberas ou pedaços de túberas, que promovem a perpetuação dos vírus e, consequentemente, o aumento da pressão de inóculo (2). Como consequência do acúmulo de vírus no material propagativo, as plantas também perdem o vigor e produzem túberas de baixa qualidade (3).

Doenças virais acometendo o inhame foram inicialmente relatadas

na década de 1930, em Serra Leoa e Porto Rico (4). Sintomas brandos e severos de mosaico foram posteriormente relatados em *D. rotundata* na Nigéria (5). Membros dos gêneros *Potyvirus*, *Cucumovirus*, *Potexvirus* e, em destaque pela importância e distribuição geográfica, do gênero *Badnavirus* (família *Caulimoviridae*), têm sido descritos em diferentes espécies de inhame (2, 6, 7).

A família *Caulimoviridae* engloba vírus de plantas que possuem o genoma formado por DNA de fita dupla (dsDNA), com tamanho de 7,2 a 9,2 Kb (8) e são classificados como pararetrovírus que não se integram ao genoma do hospedeiro para se replicar, não sendo necessário

então o genoma destes vírus codificar a proteína integrase (9). As sequências virais podem estar integradas aleatoriamente no genoma de plantas hospedeiras e são conhecidas como sequências endógenas de pararetrovírus (*Endogenous Pararetroviral Sequences* - EPRVs) (10).

As EPRVs de *Caulimoviridae* cada vez mais têm sido identificadas em muitas espécies de plantas hospedeiras (11). Estas EPRVs apresentam um padrão de arranjo similar com repetições em *tandem*, duplicações internas, fragmentações e inversão do genoma viral. Estas sequências de pararetrovírus podem resultar em genomas virais parciais e não funcionais, mas também podem promover a ativação de um genoma viral funcional que causará infecção no hospedeiro (10).

De todos os gêneros da família *Caulimoviridae*, *Badnavirus* possui o maior número de espécies descritas e caracteriza-se por apresentar partículas baciliformes com 95-130 nm de comprimento e 24-35 nm de diâmetro (12), seu genoma contém uma única molécula dsDNA circular com tamanho aproximado de 7200-7600 pb, que contem descontinuidades sítio-específicas e que podem conter uma região intergênica poli A. *Badnavirus* é o segundo maior gênero em número de espécies descritas dentre os que possuem genoma composto por DNA, superado apenas pelos *Begomovirus*.

A primeira espécie de badnavírus caracterizada em inhame foi um isolado obtido de *D. alata*, proveniente da Nigéria, e nomeado *Dioscorea alata bacilliform virus* (DaBV) (13). Posteriormente, Seal & Muller (2) em estudos sobre a diversidade molecular de isolados de *Badnavirus*, infectando inhame, nas ilhas sul do Pacífico identificaram uma nova espécie: *Dioscorea sansibarensis bacilliform virus* (2, 14, 15).

Atualmente, sete espécies de badnavírus que infectam *Dioscorea* spp. são reconhecidas pelo ICTV: *Dioscorea bacilliform AL virus* (DBALV), *Dioscorea bacilliform AL virus 2* (DBALV 2), *Dioscorea bacilliform ES virus* (DBESV), *Dioscorea bacilliform RT virus 1* (DBRTV1), *Dioscorea bacilliform RT virus 2* (DBRTV2), *Dioscorea bacilliform SN virus* (DBSNV) e *Dioscorea bacilliform TR virus* (DBTRV) (16). No entanto, estudos realizados na África e sul do Pacífico sugeriram a ocorrência de uma alta diversidade de *Badnavirus* em inhame com a possível presença de até doze espécies (14). O DBALV causa distorção foliar severa e está amplamente disseminado, sendo encontrado em infecções simples e/ou mistas com *Yam mosaic virus* e *Yam mild mosaic virus*, ambas espécies de potyvírus (17).

Nesse contexto, o presente estudo teve como objetivo interceptar e identificar molecularmente espécies de badnavírus em cinco espécies de inhame mantidas em três Institutos de ensino dos estados da Bahia, Minas Gerais e São Paulo.

MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção das Amostras

As amostras das cinco espécies de inhame analisadas foram obtidas nos bancos de germoplasma da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (ESALQ/USP), Universidade Federal de Viçosa (UFV) e Universidade Federal do Recôncavo Baiano (UFRB).

Amplificação da região RT/RNase/H e sequenciamento

O DNA total das amostras foi extraído a partir da utilização de 100 a 200 mg de tecido foliar, conforme protocolo descrito por Doyle & Doyle (18). Alíquotas de DNA foram utilizadas para as reações de amplificação por PCR (*Polymerase Chain Reaction*). Os oligonucleotídeos utilizados foram BadnaFP (5' ATGCCITTYGGIITIAARAAYGCICC-3') e BadnaRP (5' CCAYTTRCAIACISCICCCCAICC-3') (17), os quais amplificam os domínios RT/RNase/H da ORF 3 do genoma

Tabela 1. Espécies, acessos e locais de procedência das amostras de inhame utilizadas neste estudo.

Banco de Germoplasma	Espécie	Nº de Acessos
ESALQ/USP	<i>Dioscorea bulbifera</i>	44
ESALQ/USP	<i>Dioscorea cayenensis</i>	72
ESALQ/USP	<i>Dioscorea trifida</i>	53
UFV	<i>Dioscorea alata</i>	10
UFRB	<i>Dioscorea rotundata</i>	4
UFRB	<i>Dioscorea alata</i>	12
UFRB	<i>Dioscorea trifida</i>	2

de espécies de badnavírus já descritas. Os produtos de PCR foram purificados utilizando o kit GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare) e enviados para sequenciamento na Macrogen Inc. em Seul, Coreia do Sul.

Comparação de sequências, análise filogenética e de recombinação

As sequências foram editadas usando o programa CodonCode Aligner (CodonCode Corporation®) gerando uma sequência consenso de cada um dos isolados analisados, posteriormente, as sequências foram submetidas ao algoritmo BLASTn (*Nucleotide Basic Local Alignment Search Tool*).

Foram realizadas comparações pareadas entre as sequências obtidas e sequências de badnavírus depositadas no GenBank, com auxílio da ferramenta *Sequence Demarcation Tool v. 1.2* (SDT) (19). Em seguida, foi estimada a percentagem de identidade de sequências de nucleotídeos entre os isolados. De acordo com os critérios do ICTV, para determinação de espécies do gênero *Badnavirus*, foram considerados valores de identidade da RT/RNase/H superiores a 20% (8).

As sequências foram alinhadas utilizando o algoritmo MUSCLE, do software MEGA 6 (*Molecular Evolutionary Genetics Analysis*) (20). As análises filogenéticas de Máxima Verossimilhança (MV) foram obtidas aplicando-se o modelo de substituição de nucleotídeos *General Time Reversible* com distribuição gama (GTR+G). A confiabilidade da árvore obtida respeitou a análise bootstrap com 1000 repetições.

Análise para detectar locais (*breakpoints*) de recombinação e possíveis sequências parentais foi realizada utilizando o software RDP v.4.0 (*Recombination Detection Program*) (21).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Amplificação da região RT/RNase/H e sequenciamento

Um total de 235 amostras, das diferentes espécies de inhame pertencentes aos três bancos de germoplasma, foram analisadas, das quais 177 testaram positivas para badnavírus, com a amplificação de um fragmento de aproximadamente 580pb. Constatou-se uma incidência de 75,3%, sendo que a amostragem realizada a partir do banco de germoplasma da UFRB apresentou maior incidência (87,5%).

Das 177 amostras positivas na PCR, 113 foram enviadas para sequenciamento. Deste total, 42 amostras foram viáveis para a

obtenção da sequência específica referente aos domínios RT/RNase/H da ORF 3 de badnavírus.

Constatou-se alta incidência de badnavírus nos três bancos de germoplasma avaliados. Estes resultados corroboram com os encontrados por Lima et al (22), que observaram 93,7% de incidência de badnavírus ocorrendo em plantios comerciais de inhame na região Nordeste do Brasil. Em ambos estudos, a detecção e incidência foram obtidas por PCR, técnica, que apesar de não ser capaz de discriminar sequências integradas ao genoma da planta das sequências episomais, ainda é uma ferramenta de uso rotineiro para detecção das espécies pertencentes ao gênero *Badnavirus*. Portanto, deve-se considerar que a incidência pode ser superestimada e não sendo condizente com a realidade. Indexações realizadas por PCR, em genótipos de inhame, pertencentes ao Centre de Coopération Internationale en Recherche

Agronomique Pour le Développement (CIRAD, França), evidenciaram que 81% das amostras analisadas estavam infectadas por badnavírus. Entretanto, quando as mesmas amostras foram indexadas, via PAS-ELISA, foi detectada apenas 60% de incidência de badnavírus, demonstrando que a PCR amplificou sequências endógenas além das sequências episomais (23).

Para evitar a detecção de sequências endógenas, Silveira et al. (24) realizaram a indexação biológica do *Banana streak virus* (BSV), via transmissão por cochonilha, em acessos de bananeira do banco de germoplasma da Embrapa Mandioca e Fruticultura. Os resultados demonstraram uma incidência de apenas 20%, valor inferior ao obtido, por PCR, que foi de 87,5%.

Comparação de sequências, e análise filogenética e de recombinação

Tabela 2. Lista de espécies de *Badnavirus* utilizadas para as comparações de sequências e análise filogenética, com seus respectivos acrônimos e números de acesso no GenBank.

Espécies	Acrônimo	Nº de acesso no GenBank
<i>Dioscorea bacilliform sansibarensis virus</i>	DBSNV	DQ22073
<i>Dioscorea bacilliform alata virus</i>	DBALV	AM072673
<i>Dioscorea bacilliform alata virus</i>	DBALV	AM072707
<i>Dioscorea bacilliform alata virus</i>	DBALV	AM503392
<i>Dioscorea bacilliform virus</i>	DBV	AM944586
<i>endogenous Dioscorea bacilliform virus</i>	eDBV	KF829956
<i>endogenous Dioscorea bacilliform virus</i>	eDBV	KF829978
<i>endogenous Dioscorea bacilliform virus</i>	eDBV	KF829987
<i>endogenous Dioscorea bacilliform virus</i>	eDBV	KF829975
<i>Commelina yellow mottle virus</i>	CYMV	NC001343
<i>Cacao swollen shoot virus</i>	CSSV	NC001574
<i>Sugarcane bacilliform IM virus</i>	SBIMV	NC003031
<i>Banana streak OL virus</i>	BSOLV	NC003381
<i>Citrus yellow mosaic virus</i>	CYMV	NC003382
<i>Taro bacilliform virus</i>	TBV	NC004450
<i>Kalanchoe top-spotting virus</i>	KTSV	NC004540
<i>Banana streak Mysore virus</i>	BSMV	NC006955
<i>Banana streak GF virus</i>	BSGFV	NC007002
<i>Banana streak virus</i>	BSV	NC007003
<i>Sugarcane bacilliform Mor virus</i>	SBMORV	NC008017
<i>Dracaena mottle virus</i>	DMV	NC008034
<i>Bougainvillea spectabilis chlorotic vein-banding virus</i>	BSCVBV	NC011592
<i>Pelargonium vein banding virus</i>	PVBV	NC013262
<i>Sugarcane bacilliform virus</i>	SBV	NC013455
<i>Rice tungro bacilliform virus</i>	RBTV	X57924

Tabela 3. Ocorrência de *Badnavirus* em amostras de inhame pertencentes aos bancos de germoplasma analisados.

Banco de germoplasma	Nº amostras testadas	Amostras PCR positivas	Incidência de badnavírus
ESALQ/USP	169	129	76,3%
UFV	50	34	68%
UFRB	16	14	87,5%

Tabela 4. Acessos e espécies de inhame mantidos nos bancos de germoplasma utilizados para a detecção de badnavírus e análises filogenéticas.

Acessos	Espécie	Origem
CA41	<i>Dioscorea alata</i>	UFRB*
RX4	<i>Dioscorea alata</i>	UFV*
RX2	<i>Dioscorea alata</i>	UFV
DC262D	<i>Dioscorea cayenensis</i>	ESALQ/USP*
DB351	<i>Disocorea bulbifera</i>	ESALQ/USP
DB65	<i>Disocorea bulbifera</i>	ESALQ/USP
RX1	<i>Dioscorea alata</i>	UFV
STI5	<i>Dioscorea alata</i>	UFV
DC310	<i>Dioscorea cayenensis</i>	ESALQ/USP
CARA5	<i>Dioscorea alata</i>	UFV
DC21C	<i>Dioscorea cayenensis</i>	ESALQ/USP
DC2940	<i>Dioscorea cayenensis</i>	ESALQ/USP
PEZ1	<i>Dioscorea alata</i>	UFV
PEZ2	<i>Dioscorea alata</i>	UFV
MOE5	<i>Dioscorea alata</i>	UFV
MIMO5	<i>Dioscorea alata</i>	UFV
PEZ3	<i>Dioscorea alata</i>	UFV
JAPE4	<i>Dioscorea alata</i>	UFV
FLO4	<i>Dioscorea alata</i>	UFV
MOE2	<i>Dioscorea alata</i>	UFV
DC572	<i>Dioscorea cayenensis</i>	ESALQ/USP
DCT3	<i>Dioscorea alata</i>	UFV
JAPE2	<i>Dioscorea alata</i>	UFV
JAPE3	<i>Dioscorea alata</i>	UFV
PEZ4	<i>Dioscorea alata</i>	UFV
DC13D	<i>Dioscorea cayenensis</i>	ESALQ/USP
DC268	<i>Dioscorea cayenensis</i>	ESALQ/USP
DC252	<i>Dioscorea cayenensis</i>	ESALQ/USP
FLO3	<i>Dioscorea alata</i>	UFV
DC85	<i>Dioscorea cayenensis</i>	ESALQ/USP
DC201	<i>Dioscorea cayenensis</i>	ESALQ/USP
FLO1	<i>Dioscorea alata</i>	UFV
DC69	<i>Dioscorea cayenensis</i>	ESALQ/USP
DC86	<i>Dioscorea cayenensis</i>	ESALQ/USP
DC96	<i>Dioscorea cayenensis</i>	ESALQ/USP
DC56C	<i>Dioscorea cayenensis</i>	ESALQ/USP
DC56	<i>Dioscorea cayenensis</i>	ESALQ/USP
DCT1	<i>Dioscorea alata</i>	UFV
CARA3	<i>Dioscorea alata</i>	UFV
DCT2	<i>Dioscorea alata</i>	UFV
DB379B	<i>Disocorea bulbifera</i>	ESALQ/USP

*ESALQ/USP - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz/Universidade de São Paulo; UFV - Universidade Federal de Viçosa; UFRB - Universidade Federal do Recôncavo Baiano.

Análise de comparações de seqüências pareadas revelaram que cinco seqüências descritas neste trabalho apresentaram porcentagem de identidade de nucleotídeos variando entre 83-98% com isolados de *Dioscorea bacilliform AL virus* (AM503392, AM072707 e AM072673), enquanto que 36 seqüências apresentaram identidade nucleotídica entre 89-100% com badnavírus endógenos (EPRVs) ou também chamados de *endogenous Dioscorea bacilliform virus* (eDBV), conforme nomenclatura proposta por Staginnus et al. (26). Destas seqüências, 34 apresentaram maior porcentagem de identidade nucleotídica com eDBVs do grupo 9 (KF829987 e KF829975), conforme classificação proposta por Kenyon et al. (15), e com um isolado de *Dioscorea bacilliform virus* (DBV – AM944586). No entanto, duas seqüências, obtidas no presente estudo, apresentaram identidade de nucleotídeos com eDBVs pertencente ao grupo 12, proposto por Umber (26), cujo os números de acesso são KF829956 e KF829978. Foi observado ainda que a seqüência DB379B, obtida a partir de amostras de *Dioscorea bulbifera*, apresentou identidade de 85% com isolado de *Dioscorea bacilliform sansibarensis virus* (DBSNV - DQ822073), descrito em inhame na África (2). Portanto, este é o primeiro relato de DBSNV no Brasil sendo que, até o momento, somente o DBALV havia sido descrito (22).

As análises filogenéticas revelaram que os 42 isolados de DBSNV, provenientes dos bancos de germoplasma monitorados, pertenciam a quatro grupos distintos. No grupo I, 34 isolados obtidos de *D. cayenensis* e *D. alata*, procedentes dos bancos de germoplasma da ESALQ/USP e UFV, agruparam com badnavírus endógenos eDBV9 (15) e com um isolado de DBV. No grupo II, apenas dois isolados oriundos da espécie *D. bulbifera*, obtidos do banco de germoplasma da ESALQ/USP, agruparam com isolados endógenos eDBV12 (26). No grupo III, cinco isolados provenientes de *D. alata* e *D. cayenensis*, mantidos nos três bancos de germoplasma, agruparam com três isolados do DBALV, espécie relatada em inhame no Brasil (27), enquanto que no grupo IV um isolado obtido de *D. bulbifera*, procedente do banco de germoplasma da ESALQ, agrupou com o DBSNV, espécie, até então, não relatada no Brasil.

Diante dos resultados obtidos, foi possível constatar a presença do DBALV e DBSNV nos acessos de inhame mantidos nos distintos bancos de germoplasma avaliados.

O primeiro relato de DBALV, em inhame, no Brasil, ocorreu nos estados da Bahia e Pernambuco (27). Posteriormente, um estudo sobre a variabilidade genética de isolados de badnavírus em *Dioscorea* spp., provenientes de áreas produtoras dos estados de Alagoas, Paraíba e Pernambuco, sugeriram que DBALV ocorria, exclusivamente, em inhame na região Nordeste do Brasil (22, 28). Nessa região, o DBALV foi detectado em *D. alata* e *D. cayenensis*, encontrando-se amplamente disseminado devido à constante substituição de material propagativo (túberas) e a proximidade entre as áreas de cultivo (16). Pesquisas sobre incidência e distribuição de vírus que infectam inhame em países da África e Sul do Pacífico revelaram que DBALV também é prevalente nas áreas de plantio comercial de inhame (14, 15, 29, 30).

O isolado DB359, obtido de *D. bulbifera*, proveniente do banco de germoplasma da ESALQ/USP, foi identificado como sendo pertencente à espécie DBSNV. Este vírus foi originalmente descrito no Benin, na África, causando sintomas de deformação e mosaico foliar (2). Posteriormente, o DBSNV também foi relatado em amostras de *D. alata* e *D. rotundata*, provenientes da Nigéria, Gana, Togo e Benin (14). Diante da amostragem e análises das espécies de inhame mantidas nos bancos de germoplasma, constatou-se a primeira ocorrência do DBSNV no Brasil. Até então, haviam somente relatos da ocorrência do DBALV,

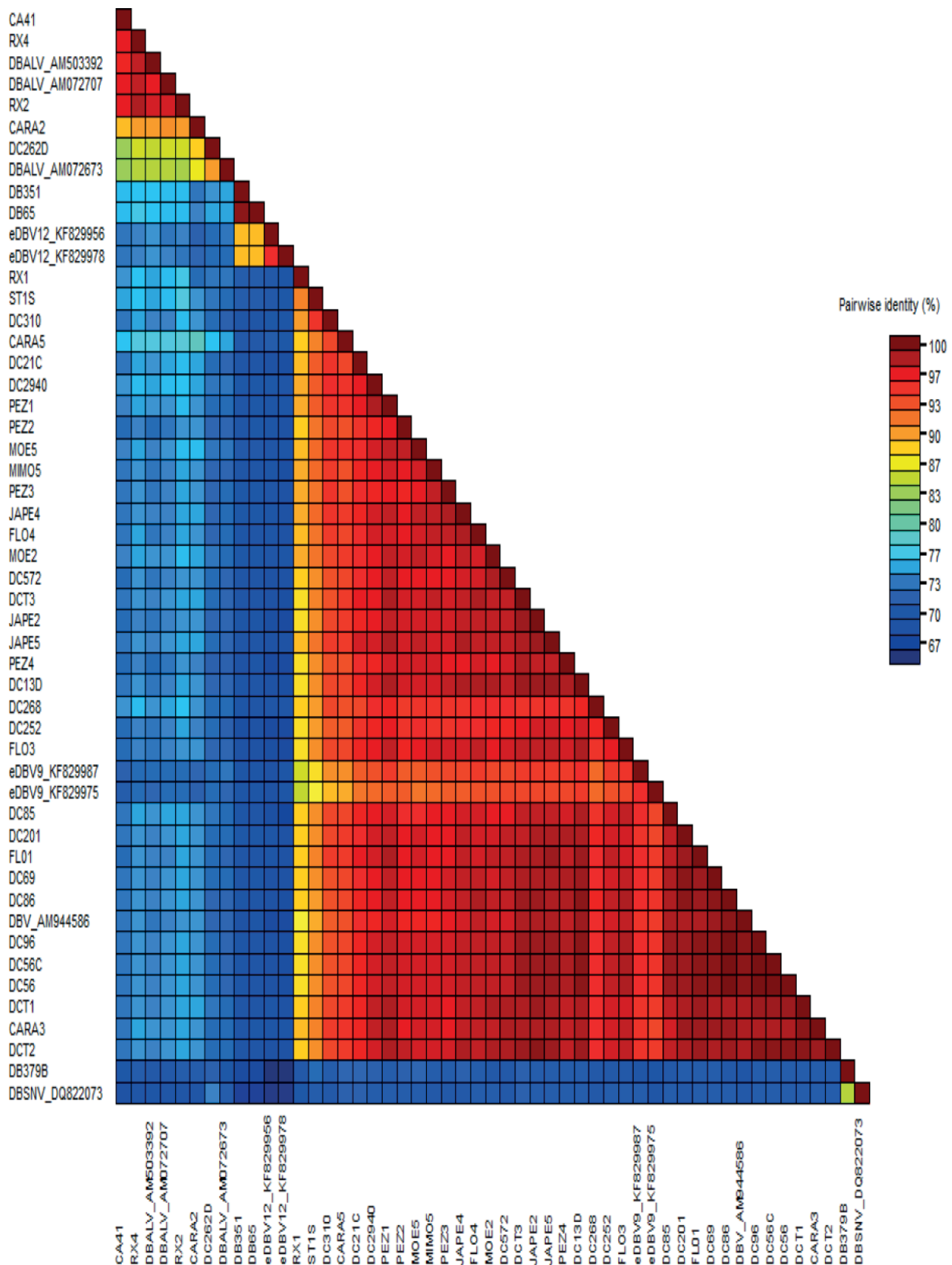


Figura 1. Porcentagem de identidade e comparações pareadas de seqüências nucleotídicas da região RT/RNase dos isolados de *Dioscorea bacilliform alata virus* (DBALV) e *Dioscorea bacilliform sansibarensis virus* (DBSNV) com outras seqüências de espécies de badnavírus disponíveis no GenBank (Matriz bidimensional).

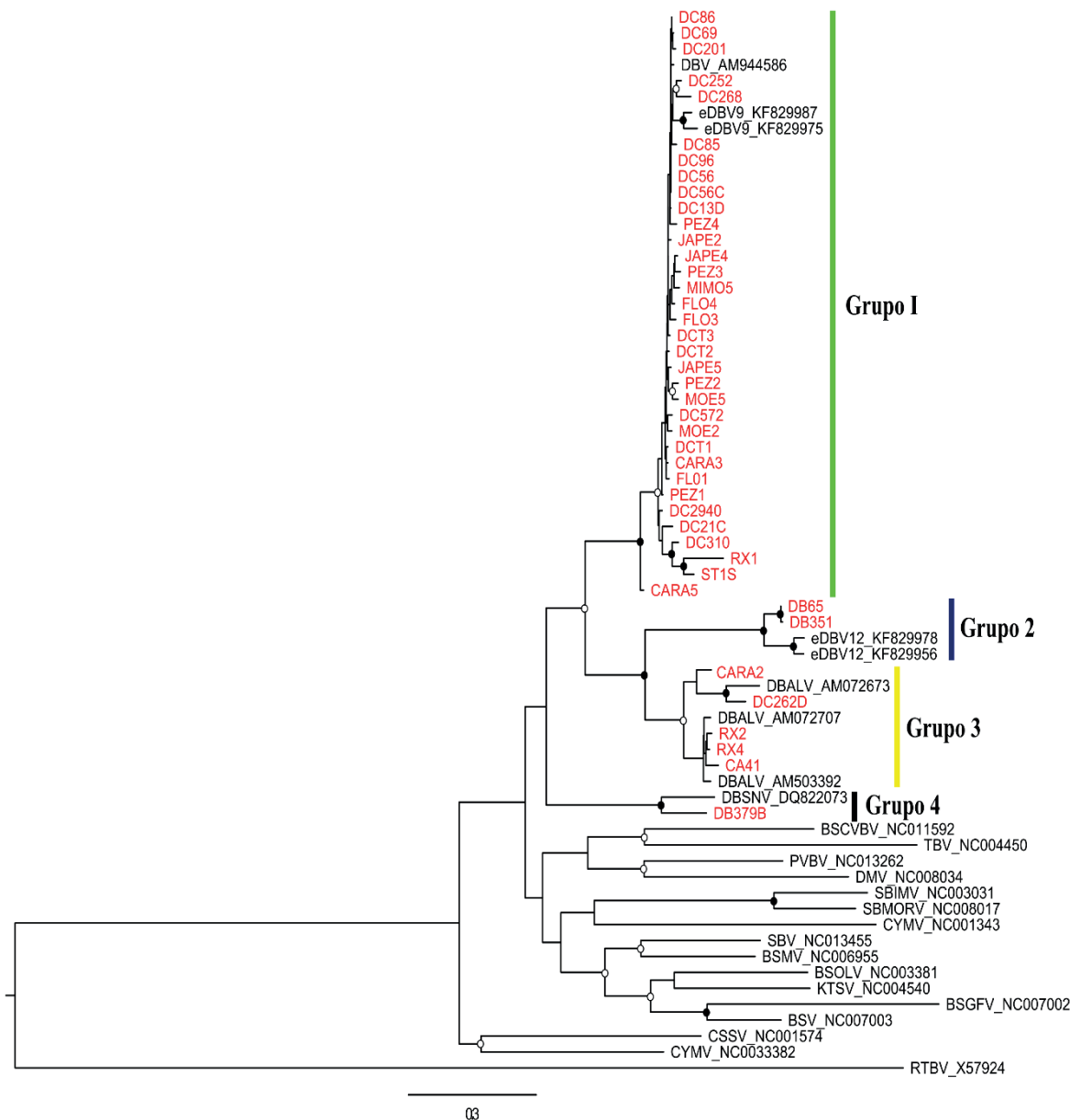


Figura 2. Árvore filogenética de Máxima Verossimilhança baseada em sequências da região RT/RNase de isolados de *Badnavirus* provenientes de amostras de inhame obtidas durante levantamentos realizados nos bancos de germoplasmas e outras espécies de *Badnavirus* disponíveis no GenBank. O *Rice tungro bacilliform virus* (RTBV), gênero *Tungrovirus*, foi utilizado como grupo externo.

em inhame, na Região Nordeste do Brasil (22, 27, 28). Este, também, constitui o primeiro relato de DBSNV em *D. bulbifera*, sugerindo que, assim como DBALV, a espécie viral não possui hospedeiras específicas dentro do gênero *Dioscorea*.

Apesar do ICTV reconhecer sete espécies de badnavírus capazes de infectar inhame, estudos baseados em PCR e RCA indicaram elevada diversidade destes vírus na costa sul do Oceano Pacífico, África, sugerindo a ocorrência de pelo menos 4 outras espécies de possíveis badnavírus infectando *Dioscorea* spp. (16, 29). Esta alta diversidade deve-se, em parte, devido a existência de um grande número de espécies de inhame como *D. alata*, *D. cayenensis*, *D. rotundata*, *D. sansibarensis* em áreas de cultivo no continente africano, e *D. bulbifera*, *D. dumedorum*, *D. numularia* e *D. penthaphylla* nas ilhas do sul do Pacífico (13, 14, 15, 29). Além disso, esta grande diversidade

também pode refletir a alta variabilidade das espécies de badnavírus infectando inhame. Por exemplo, a frequência de mutação estimada para populações de DBALV, provenientes do Nordeste do Brasil, é em torno de 10^{-4} , semelhante àquelas encontradas para outros vírus de DNA e RNA (28).

Os demais isolados analisados durante o levantamento demonstraram alta identidade com sequências de badnavírus endógenos (eDBV), dos quais 34 isolados agruparam com eDBVs do grupo 9 (15) e com um isolado de *Dioscorea bacilliform virus* – DBV, proveniente do Benin (AM944586), enquanto que dois isolados agruparam com eDBVs do grupo 12 (26). O isolado de DBV (BN4dr/AM944586), utilizado durante a realização do levantamento, foi descrito como sendo uma possível nova espécie de badnavírus que infecta inhame em regiões da África ocidental (14), que, posteriormente, foi descrito como eDBVs do

grupo 9, conforme classificação definida por Kenyon (15). Portanto, de acordo com Seal et al. (23), para diferenciar se sequências como eDBVs estão integradas ao genoma do inhame ou presentes como sequências epissomais, testes adicionais como PAS-ELISA, ISEM e Southern Blotting são recomendados para confirmar a sua presença nos acessos dos bancos de germoplasma avaliados, e verificar a probabilidade dessas sequências serem ativadas, culminando em possíveis infecções.

A presença de sequências virais endógenas (EPRVs) integradas em genomas de plantas tem sido relatada para uma ampla gama de famílias botânicas, das quais podem ser citadas: Musaceae, Solanaceae e Poaceae (11, 31). Porém, para espécies da família Dioscoreaceae, relatos destas sequências integradas em seu genoma ainda são escassos. As análises de sequências de amostras de inhame, provenientes da região do sul do Pacífico, indicaram uma possível presença de sequências de badnavírus integradas em genomas de inhame (15). Bousalem et al (29) analisaram 121 sequências provenientes de inhame, obtidos de regiões do Caribe, América do Sul e África e detectaram a presença de 12 espécies pertencentes ao gênero *Badnavirus* e aventaram a possibilidade da presença de EPRVs no genoma da planta. Estudos realizaram a confirmação e caracterização de sequências endógenas (eDBV) integradas ao genoma de espécies de inhame, pertencentes ao complexo *D. cayenensis-rotundata* (2, 26). No entanto, a natureza infecciosa dos eDBV, relatados para inhame, ainda não está totalmente estabelecida.

Há poucos relatos de EPRVs capazes de gerar partículas infecciosas, pois a maioria destas não é capaz de infectar a hospedeira (11). Há ainda relatos de que EPRVs podem conferir vantagens ao seu hospedeiro, fornecendo resistência aos seus vírus cognatos (2). A detecção confiável de espécies de badnavírus de inhame representa um desafio, uma vez que é necessário utilizar ferramentas que possam detectar e diferenciar as sequências epissomais das sequências integradas. A técnica de PCR, bem como a sorológica têm sido amplamente utilizadas para detecção de badnavírus em amostras de inhame (4, 32). Contudo, não podem ser aplicadas para detecção de sequências endógenas pelo fato de não fornecer uma diferenciação das sequências epissomais e integradas. Técnicas como PCR-Imunocaptura já foram relatadas como sendo capaz de distinguir sequências epissomais das EPRVs de BSV, porém para inhame a utilização desta técnica não forneceu resultados confiáveis (2). Uma abordagem alternativa utilizando RCA (*Rolling circle amplification*) como método de diferenciação de sequências epissomais e integradas de BSV, em cultivares de banana (*Musa* spp.), sendo possível inclusive detectar de maneira diferencial sequências integradas de *Sugarcane bacilliform virus* (SCBV), em cana de açúcar, e *Cauliflower mosaic virus* (CaMV), em nabo, mostrou-se bastante eficiente (32). Como observado para BSV, esta técnica pode ser utilizada para detecção de formas epissomais de badnavírus no inhame.

Os resultados obtidos no presente estudo demonstram a presença de DBALV e DBSNV nos bancos de germoplasma avaliados. A detecção de DBALV pode ser explicada pelo fato de que os acessos de *D. alata* e *D. cayenensis*, disponíveis nos Bancos de Germoplasma, foram, em grande parte, oriundos da região Nordeste, onde altos níveis de incidência de DBALV são registrados. No entanto, não se pode descartar a hipótese de que DBALV tenha sido incorporado aos Bancos de Germoplasma por meio da introdução de material propagativo, visto que os acessos são mantidos em cultivo protegido.

Embora este seja o primeiro relato de DBSNV infectando inhame no Brasil, não se pode afirmar que sua existência no país seja recente, uma vez que, até então, os estudos de incidência de badnavírus que infectam inhame estavam restritos apenas à região Nordeste, onde é relatada prevalência do DBALV. Diante dessa constatação, torna-se de extrema importância a continuidade de estudos que possam fornecer

informações mais precisas sobre a ocorrência de DBSNV em áreas produtoras do país, afim de possibilitar o uso de medidas de controle efetivas visando evitar a dispersão para áreas livres da ocorrência destas duas espécies de badnavírus.

Apesar de Bousalem et al. (29) relatarem a detecção de um evento de recombinação entre dois isolados de badnavírus, DeBV-B e DeBV-A, obtidos de *D. alata*, as análises realizadas não detectaram a ocorrência de recombinação, estando esse fato possivelmente relacionado com a pequena região genômica analisada.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Tecnológico e Científico (CNPq), a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Alagoas (FAPEAL) pelo apoio nas pesquisas.

REFERÊNCIAS

1. Mantell, S.H. Integrated use of micropropagation and conventional propagation Techniques for the production of certified seed tubers of tropical yams (*Dioscorea* spp.). In: **Proceedings of the Southern Asian Regional Workshop on Propagation techniques for Commercial Crops of the Tropics**. Ho Chi Minh City, 1993.
2. Seal, S.; Muller, E. Molecular analysis of a full-length sequence of a new yam badnavirus from *Dioscorea sansibarensis*. **Archives of Virology**, Chatham Maritime. v. 152, p. 819-825, 2007.
3. Amusa, N.A.; Adegbita, A.A.; Muhammed, S.; Daiyewu, R. Yam diseases and its management in Nigeria. **African Journal of Biotechnology**, Ibadan v. 2, p. 497-502, 2003.
4. Cook, A.A. Diseases of tropical and sub tropical vegetables and other plants. **New York: Hafner Press**, 381p. 1978.
5. Terry, E.R. Incidence, symptomatology, and transmission of a yam virus in Nigeria. In: Proceedings of the 4th symposium of the international society for tropical root crops, 1976. Cali, Ed. J. Cock, R. McIntyre E M. Graham, 1976. p. 170-173.
6. Odu, B.O.; Hughes, J.D'a.; Asiedu, R.; Ng, N.Q.; Shoyinka, S.A.; Oladiran, O.A. Responses of white yam (*Dioscorea rotundata*) cultivars to inoculation with three viruses. **Plant Pathology**, Croydon v. 53, p. 141-147, 2004.
7. Odu, B.O.; Asiedu, R.; Shoyinka, S.A.; Hughes, J.d'A. Reaction of White Guinea yam (*Dioscorea rotundata* Poir.) genotypes to virus diseases in four agroecological zones in Nigeria. **Journal of Phytopatology**, Ibadan v. 154, p. 688-693, 2006.
8. Geering, A.D. W.; Hull, R. Family *Caulimoviridae*. In: King A.M.Q.; Adams M.J.; Carstens E.B.; Lefkowitz, E.J. **Virus Taxonomy. 9th Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses**. London UK. Elsevier Academic Press. p. 429-443, 2012.
9. Bhat, A.I.; Hohn. T.; Selvarajan, R. Badnaviruses: The Current Global Scenario. **Viruses**, Kerala. 2016.
10. Gayral, P.; Iskra-Caruana, M. Phylogeny of *Banana streak virus* Reveals Recent and Repetitive Endogenization in the Genome of Its Banana Host (*Musa* sp.). **Journal of Molecular Evolution**, Montpellier. v. 69, p. 65-80, 2009.
11. Geering, A.D.; Scharaschkin, T.; Teycheney, P.Y. The classification and nomenclature of endogenous viruses of the family *Caulimoviridae*. **Archives of Virology**, Bruce. v. 155, n. 1, p. 123-31, 2010.
12. Fauquet, C.M.; Mayo, M.A.; Maniloff, J.; Desselberger, U.; Ball, L.A. **Virus taxonomy**. Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Amsterdam. Elsevier. 2005.
13. Phillips, S.; Hull, R.; Briddon, R.W.; Brunt, A.A. The Partial Characterization of a Badnavirus Infecting the Greater Asiatic or Water Yam (*Dioscorea alata*). **Journal of Phytopathology**, Babardos. v. 147, p. 265-269, 1999.
14. Eni, A.O.; Hughes, J'd.; Asiedu, R.; Rey, M.E. Sequence diversity among *Badnavirus* isolates infecting yam (*Dioscorea* spp.) in Ghana, Togo, Benin and Nigeria. **Archives of Virology**, Ibadan v.153, p. 2263-2272, 2008.
15. Kenyon, L.; Lebras, B.S.; Seal, S.E. Yams (*Dioscorea* spp.) from the South Pacific Islands contain many novel badnaviruses: implications for international movement of yam germplasm, **Archives of Virology**, Chatham Maritime . v. 3, p.877-889, 2008.

16. Bömer, M.; Rathnayake, A.I.; Visendi, P.; Silva, G.; Seal, S.E. Complete genome sequence of a new member of the genus *Badnavirus*, *Dioscorea bacilliform RT virus 3*, reveals the first evidence of recombination in yam badnaviruses. **Arch Virol** 163, 533–538. 2018.
17. Yang, I.C.; Hafner, G.J.; Dale, J.L.; Harding, R.M. Genomic characterisation of taro bacilliform virus. **Archives of Virology**, Brisbane. v. 148, p. 937-949, 2003.
18. Doyle, J.J.; Doyle, J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, Ithaca. v.1, p.13-15, 1991.
19. Muhire, B.; Martin, D. P.; Brown, J.K.; Navas-Castillo, J.; Moriones, E.; Zerbini, F.M.; Rivera-Bustamante, R.; Malathi, V.G.; Briddon, R.W.; Varsani, A. A genome-wide pairwise-identity-based proposal for the classification of viruses in the genus *Mastrevirus* (family *Geminiviridae*). **Archives of virology**, v. 158, p. 1411-1424. 2013.
20. Tamura, K.; Stecher, G.; Peterson D.; Filipiski, A.; Kumar, S. **MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. Molecular Biology and Evolution**, v. 30, p. 2725-2729, 2013.
21. Martin, D.P.; Murrell, B.; Golden, M.; Khoosal, A.; Muhire, B. RDP4: Detection and analysis of recombination patterns in virus genomes. **Virus Evolution**, p. 1-5, 2015.
22. Lima, J.S.; Lima, A.T.M.; Castilho-Urquiza, G.P.; Silva, S.J.C.; Assunção, I.P.; Michereff, S.J.; Zerbini, F.M.; Lima, G.S.A. Variabilidade genética de isolados de badnavirus infectando inhame (*Dioscorea* spp.) no Nordeste do Brasil. **Tropical Plant Pathology**, Recife. v.38, p.349-353, 2013.
23. Seal, S.; Turaki, A.; Muller, E.; Kumar, P.L.; Kenyon, L.; Filloux, D.; Galzi, S.; Lopez-Montes, A.; Iskra-Caruana, M.L. The prevalence of badnaviruses in West Africa yams (*Dioscorea cayenensis-rotundata*) and evidence of endogenous pararetrovirus sequences in their genomes. **Virus Research**. Chatham Maritime, 2014.
24. Silveira, D.G.; Meissner-Filho, P.E.; Soares, T.M.; Sanches, N.F.; Figueiredo, D.V.; Brioso, P.S.T. Indexação biológica de genótipos de bananeira para o *Banana streak virus*. **Summa Phytopathol.** Botucatu, v. 34, n. 2, p. 172-174, 2008.
25. Staginnus, C.; Iskra-Caruana, M.L.; Lockhart, B.; Hohn, T.; Richert-Poggeler, K.R. Suggestions for a nomenclature of endogenous pararetroviral sequences in plants. **Archives of Virology**, Frankfurt. n.154, p.1189–1193, 2011.
26. Umber, M.; Filloux, D.; Muller, E.; Laboureau, N.; Galzi, S.; Roumagnac, P.; Iskra-Caruana, M.L. Pavis, C.; Teycheney, P.Y.; Seal, S.E. et al. The genome of African yam (*Dioscorea cayenensis-rotundata* complex) hosts endogenous sequences from four distinct badnavirus species. **Molecular Plant Pathology**, Petit-Bourg, (Guadeloupe) pp.12137, 2014.
27. Andrade, G.P. **Diagnóstico fitossanitário da cultura do inhame (*Dioscorea* spp.) em áreas produtoras do nordeste do Brasil**. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE). Recife, PE, 2007.
28. Guimarães, K.M., Silva, S.J.C., Melo, A.M., Ramos-Sobrinho R, Lima. J.S., Zerbini, F.M., Assunção, I.P., Lima, G.S.A. Genetic variability of badnaviruses infecting yam (*Dioscorea* spp.) in northeastern Brazil. **Tropical Plant Pathology**, v. 40, p.111-118, 2015.
29. Bousalem, M.; Durand, O.; Scarcelli, N.; Lebas, B.S.; Kenyon, L.; Marchand, J.L.; Lefort, F.; Seal, S.E. Dilemmas caused by endogenous pararetroviruses regarding the taxonomy and diagnosis of yam (*Dioscorea* spp.) badnaviruses: analyses to support safe germplasm movement. **Archives of Virology**, Petit-Bourg. v. 154, p.297–314, 2009.
30. Asala, S.; Alegbejo, M.D.; Kashina, B.D.; Banwo, O.O. Distribution and incidence of viruses infecting yam (*Dioscorea* spp.) in Nigeria. **Global Journal of Bio-Science & Biotechnology**, Zaria. vol 1(2), 163-167, 2012.
31. Iskra-Caruana, M.L.; Baurens, F.C.; Gayral, P.; Chabannes, M. A four-partnerplant–virus interaction: enemies can also come from within. **Molecular Plant Microbe Interactions**, v.23, 1394–1402 p., 2010.
32. James, A.P.; Geijskes, R.J.; Dale, J.L.; Harding, R.M. Development of a novel rolling-circle amplification technique to detect *Banana streak virus* which also discriminates between integrated and episomal virus sequences. **Plant Disease**, Brisbane. v.95, p.57-62, 2010.