



Variabilidade genética de isolados de badnavírus infectando inhame (*Dioscorea* spp.) no Nordeste do Brasil

Joyce Silva Lima¹, Alison T.M. Lima², Gloria P. Castillo-Urquiza², Sarah J.C. Silva³, Iraídes P. Assunção³, Sami J. Michereff¹, F. Murilo Zerbini² & Gaus S.A. Lima³

¹Departamento de Agronomia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, 52171-900, Recife, Pernambuco, Brasil;

²Departamento de Fitopatologia/BIOAGRO, Universidade Federal de Viçosa, 36570-000, Viçosa, Minas Gerais, Brasil;

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

Autor para correspondência: Gaus S. A. Lima; e-mail: gaus@ceca.ufal.br

RESUMO

Viroses causadas por vírus do gênero *Badnavirus* são responsáveis por grandes prejuízos à cultura do inhame no Nordeste brasileiro. O conhecimento da variabilidade destes patógenos pode fornecer informações importantes sobre seu potencial evolutivo, permitindo a elaboração de melhores estratégias de manejo da doença. A análise de 425 amostras foliares de inhame coletadas em três estados do Nordeste brasileiro, em 2010, revelou uma alta incidência (93,3%) de badnaviroses. Para avaliar a variabilidade genética dos badnavírus infectando inhame, um fragmento de 579 nucleotídeos correspondente à região codificante da transcriptase reversa (RT)/RNaseH dos isolados amostrados foi amplificada por PCR e sequenciada. A análise filogenética das sequências de nucleotídeos revelou que os isolados dividem-se em dois grupos. Um é altamente relacionado com *Dioscorea bacilliform AL virus* (DBALV), enquanto o outro forma um clado altamente divergente dentro do gênero *Badnavirus*. Os isolados de DBALV apresentam 70-98% de identidade nucleotídica entre si e foram detectados em todas as áreas avaliadas e em *D. alata* e *D. cayennensis*, as duas espécies de inhame mais cultivadas no Nordeste. Os isolados do outro grupo compartilham 47-58% de identidade com isolados de DBALV e 78-95% entre si e foram encontrados apenas em *D. alata* na Paraíba.

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

ABSTRACT

Genetic variability of badnavirus isolates infecting yam (*Dioscorea* spp.) in northeastern Brazil

Diseases caused by viruses of the genus *Badnavirus* are responsible for great losses in yam crops in northeastern Brazil. Knowledge of pathogen variability can provide important information about its evolutionary potential and may allow for development of better strategies for disease management. The analysis of 425 leaf samples of yam obtained in 2010 in three states of northeastern Brazil revealed a high incidence (93.3%) of badnaviruses. To evaluate the variability of yam-infecting badnaviruses, a 579-nucleotide fragment corresponding to the reverse transcriptase (RT)/RNaseH coding region was PCR-amplified and directly sequenced. Phylogenetic analysis of nucleotide sequences revealed that the isolates can be divided into two groups. The first group is highly related to *Dioscorea bacilliform AL virus* (DBALV), while the other set of sequences formed a highly divergent clade within the genus *Badnavirus*. The DBALV isolates have 70-98% nucleotide sequence identity with each other. DBALV was detected in all areas assessed and in the two most cultivated species of yam in the northeast (*D. alata* and *D. cayannensis*). The other group shares 47-58% nucleotide sequence identity with the DBALV isolates and 78-95% amongst themselves, and was found only in *D. alata* in the state of Paraíba.

Key words: *Dioscorea bacilliform AL virus*, endogenous sequences, RT/RNaseH.

O inhame (*Dioscorea* spp.) é uma cultura de importância econômica e social nas regiões tropicais, incluindo o nordeste do Brasil que produziu 38.256 toneladas em 2006 (IBGE, 2013). A área plantada com inhame tem crescido nessa região graças à demanda para exportação, contudo os produtores não têm conseguido atingir as metas das empresas de comércio exterior principalmente pela baixa qualidade do produto devido a problemas de ordem fitossanitária (Moura, 2005).

Dioscorea cayennensis Lam. e *D. alata* L. são as espécies predominantes nas regiões produtoras do nordeste brasileiro. Uma vez que a floração e a produção de sementes são raras, o inhame é propagado por túberas-semente ou

seções da túbera (Asiedu, 2010). A propagação assexuada do inhame favorece a perpetuação de doenças, em especial as de etiologia viral. Os sintomas de viroses em inhame, principalmente mosaico, resultam da perda parcial da atividade fotossintética e consequente redução na produção de açúcar e armazenamento de amido, causando assim significativa redução no rendimento e qualidade das túberas (Thouvenel & Dumont 1990).

Os vírus conhecidos que infectam o inhame pertencem aos gêneros *Potyvirus*, *Badnavirus*, *Potexvirus* e *Cucumovirus*, sendo os *Potyvirus* os mais bem caracterizados e amplamente disseminados. De um modo geral não se pode atribuir com precisão um sintoma a uma determinada espécie viral, pois

viroses distintas podem levar a sintomas semelhantes, além do fato das infecções mistas serem relativamente frequentes (Thouvenel & Fauquet, 1979).

Os badnavírus (gênero *Badnavirus*, família *Caulimoviridae*) são descritos infectando uma ampla gama de culturas tropicais de importância econômica, dentre elas o inhame (Briddon et al., 1999). São vírus com genoma composto de DNA de fita dupla (dsDNA) que replicam por meio de um intermediário de RNA utilizando transcrição reversa. As partículas virais são baciliformes, não envelopadas, contendo o genoma circular de dsDNA com 7.0-7.6 kb (Geering & Hull, 2012). A família *Caulimoviridae* tem recebido maior atenção desde a década passada devido à descoberta de sequências endógenas pararetrovirais (EPRVs). Há evidências que estas EPRVs integram-se por recombinação ilegítima no genoma do hospedeiro, e que sua presença não está necessariamente associada com a infecção (Geering et al., 2005; Ndowora et al., 1999). No entanto, em alguns casos, essas cópias cromossômicas podem dar origem ao vírus na forma episomal e gerar infecção sistêmica (Ndowora et al., 1999; Geering et al., 2005).

Badnaviroses são amplamente distribuídas em todas as regiões onde há o cultivo de inhame, principalmente no oeste da África (Eni et al., 2008). Os badnavírus que infectam inhame são classificados em duas espécies: *Dioscorea bacilliform AL virus* (DBALV) e *Dioscorea bacilliform SN virus* (DBSNV) (Geering & Hull, 2012).

Estudos moleculares de badnavírus infectando inhame em outras culturas revelaram alta variabilidade genética (Bouhida et al., 1993; Kenyon et al., 2008). Portanto, é importante determinar a variabilidade dos badnavírus infectando inhame no nordeste brasileiro para assegurar um diagnóstico confiável, e possibilitar estratégias de controle mais eficientes.

Neste trabalho avaliou-se a variabilidade genética e a distribuição de badnavírus infectando inhame nos estados de Alagoas, Pernambuco e Paraíba.

Foram coletadas amostras foliares de 425 plantas de inhame, sendo 85 provenientes de cada uma de cinco áreas de cultivo nas principais regiões produtoras da Zona da Mata dos estados de Alagoas (Arapiraca, Viçosa e Paulo Jacinto), Pernambuco (Bonito) e Paraíba (Alhandra). As amostras foram coletadas de plantas apresentando sintomas característicos de infecção causada por vírus, como mosaico, cordão-de-sapato e nanismo (Rossel & Thottappilly, 1985).

A extração do DNA total foi feita em todas as amostras coletadas individualmente a partir de discos foliares com cerca de 1 cm de diâmetro de acordo com Doyle & Doyle (1987) e serviu de molde para as reações de amplificação por PCR. O par de oligonucleotídeos utilizado, BadnaFP (5'-ATGCCITTYGGIITIAARAAYGCICC-3') e BadnaRP (5'-CCAYTTRCAIACISCICCCCAICC-3') (Yang et al., 2003), foi baseado no domínio RT/RNaseH da ORF 3 do genoma de vários badnavírus já descritos.

As reações foram realizadas em volume total de 60 µL, contendo 6 µL de tampão 10X (KCl 100 mM, Tris-HCl 100 mM pH 9,0, Triton-X 1%), 4,8 µL de dNTPs 2,5 mM,

1,8 µL de MgCl₂ 50 mM, 3 µL de cada oligonucleotídeo (10 µM), 1 U de Taq DNA Polimerase, 1 µL de DNA (10 a 100 ng) e 40 µL de água ultrapura. As condições de amplificação foram: desnaturação inicial de 94°C por 4 min, 94°C por 30 s, 50°C por 30 s, 72°C por 30 s. Os ciclos foram repetidos 35 vezes exceto o passo inicial e a extensão final a 72°C por 10 min. Após a amplificação, os produtos foram analisados em gel de agarose a 0,8%, em tampão TBE (Tris-Borato, EDTA 0,5M pH 8,0), corado com brometo de etídeo e visualizado sob luz ultravioleta.

Os produtos da amplificação foram purificados utilizando-se o kit GFX PCR DNA and Gel Band Purification (GE Healthcare). O sequenciamento foi realizado comercialmente (Macrogen Inc., Seul, Coréia do Sul), diretamente a partir dos produtos de PCR purificados. As sequências de nucleotídeos foram inicialmente submetidas ao algoritmo BLASTn para determinação preliminar das espécies com base no nível limite de 80% estabelecido pelo ICTV (Geering & Hull, 2012). As sequências foram alinhadas com base no algoritmo MUSCLE disponível no programa MEGA 5 (Tamura et al., 2011). As sequências alinhadas foram importadas para o programa PAUP* 4 (Swofford, 2003) para análise filogenética. Árvores iniciais foram construídas usando o método Neighbour-Joining. Estas foram posteriormente comparadas com as árvores de consenso construídas a partir de análise de máxima verossimilhança com “bootstrapping” de 1000 repetições. Análise de inferência Bayesiana foi feita utilizando-se o programa MrBayes v3.1.2 (Ronquist & Huelsenbeck, 2003). Sequências de outras espécies pertencentes à família *Caulimoviridae*, disponíveis no GenBank, foram incluídas em todas as análises para comparação.

Um produto de PCR com tamanho esperado (cerca de 580 nt) foi observado em 396 amostras, indicando uma incidência de *Badnavirus* de 93,3%. Para as amostras negativas supõem-se que outros vírus estejam associados aos sintomas observados. Por outro lado não se pode eliminar a possibilidade de as amostras positivas para *Badnavirus* também estarem infectadas com outros vírus, uma vez que o procedimento utilizado foi específico para *Badnavirus*. Dentre as amostras positivas para *Badnavirus* foram escolhidas 50, sendo 10 de cada área, para sequenciamento do produto de PCR.

As análises de máxima verossimilhança e inferência Bayesiana resultaram em árvores com topologias semelhantes. Ambas as árvores apresentaram um ramo monofilético significativamente suportado pelos valores de *bootstrap* e probabilidades posteriores para máxima verossimilhança e inferência Bayesiana, respectivamente. As sequências agruparam em dois grupos, sendo o grupo I constituído por 46 sequências que agruparam com a espécie DBALV e o grupo II por quatro sequências (Figura 1). Esses isolados não se agruparam por origem geográfica ou espécies hospedeiras, pois foram encontrados nas cinco áreas de cultivo amostradas, causando infecção tanto em *D. cayennensis* quanto em *D. alata*.



FIGURA 1 - Árvore de máxima verossimilhança baseada nas sequências de um fragmento de 579 pares de bases correspondente à região RT/RNase H do genoma de badnavírus. Os números acima nos ramos indicam valores de “bootstrap” (1.000 repetições). Os números abaixo dos ramos indicam o valor das probabilidades posteriores calculados por inferência Bayesiana (árvore com a mesma topologia).

As quatro sequências do grupo II (todas provenientes de Alhandra, PB) foram altamente divergentes em relação ao grupo I e não agruparam com nenhuma sequência de badnavírus proveniente de inhame (Figura 1). De fato, essas sequências agruparam com sequências endógenas de tomateiro (dados não mostrados), sugerindo que podem ser sequências endógenas integradas no genoma do inhame (Bousalem et al., 2009).

Doenças causadas por vírus do gênero *Badnavirus* têm sido descritas em *Dioscorea* spp. em vários países produtores, com relatos em *D. alata*, *D. cayenensis*, *D. rotundata* e *D. sansibarensis* na África (Phillips et al., 1999; Eni et al., 2008) e em *D. bulbifera*, *D. dumetorum*, *D. nummularia* e *D. pentaphylla* no sul do Pacífico (Phillips et al., 1999).

As espécies de inhame mais amplamente cultivadas no nordeste brasileiro são *D. alata* e *D. cayenensis*, ambas avaliadas neste estudo e nas quais foi constatada a incidência de badnavírus. A predominância de uma única espécie de badnavírus nas amostras analisadas deve-se, provavelmente, à proximidade geográfica entre as áreas de coleta e à constante troca de material vegetal entre essas áreas, levando à disseminação de túberas infectadas. A predominância do DBALV corrobora os resultados da análise de três sequências correspondentes à região RT/RNase provenientes de Cruz das Almas (Bahia), Itapissuma e Quipapá (Pernambuco), onde a única espécie de badnavírus encontrada foi também DBALV (Andrade, 2007). A presença do DBALV em Alagoas, Bahia, Paraíba e Pernambuco sugere uma ampla distribuição e prevalência dessa espécie na região Nordeste do Brasil.

Contudo, estudos realizados na África e do sul do Pacífico sugerem a ocorrência de uma maior diversidade de espécies de badnavírus em inhame, com a possível presença de até doze espécies (Eni et al., 2008; Kenyon et al., 2008; Bousalem et al., 2009). Entretanto, esses estudos analisaram sequências parciais, ou regiões distintas das utilizadas para a classificação taxonômica. Com base na análise da região RT/RnaseH, o ICTV reconhece atualmente apenas duas espécies de badnavírus de inhame, o DBALV e o DBSNV (Geering & Hull, 2012). A amplificação de possíveis sequências endógenas de pararetrovírus (EPRVs) integradas ao genoma de inhame pode ter ocorrido em consequência da estratégia utilizada, de amplificação via PCR a partir de DNA total extraído das amostras. A utilização da amplificação por círculo rolante ("rolling circle amplification", RCA) distingue sequências endógenas de vírus que se encontram na forma episossomal. Essa técnica foi utilizada por James et al. (2011) para a detecção do badnavírus *Banana streak virus* (BSV) em amostras de bananeira que contém sequências episossomais e endógenas ativáveis do vírus. Assim, a amplificação de fragmentos de genomas virais via PCR a partir de plantas de inhame RCA-negativas poderia confirmar a natureza endógena das sequências.

Kenyon et al. (2008) também encontraram vários grupos divergentes de sequências de badnavírus referentes

à região RT/RNaseH em amostras de inhame no sul do Pacífico, utilizando o mesmo par de oligonucleotídeos utilizado neste estudo. Fortes evidências, como a alta identidade entre sequências do mesmo grupo, deleções de aminoácidos e ORFs não funcionais, além da associação com uma única hospedeira, indicam que alguns desses grupos de sequências podem ser sequências endógenas.

A forma endógena do vírus é de extrema importância na detecção e no controle de badnavirose, pois vários fatores têm sido descritos como desencadeadores dessas doenças devido à geração de formas episossomais dos vírus a partir das formas endógenas integradas (Gayral & Iskra-Caruana, 2009). Os resultados deste estudo têm várias implicações importantes para o diagnóstico de badnavirose em inhame. Essas viroses podem ser consideradas de grande importância como fator limitante no intercâmbio nacional e internacional de material propagativo, devido à presença de sequências integradas que podem ser ativadas e causar doença (Kenyon et al., 2008; Bousalem et al., 2009).

Este trabalho representa um estudo abrangente em nível molecular da variabilidade de sequências de badnavírus infectando inhame no Brasil, e indica a ampla distribuição do DBALV na região Nordeste. O aprimoramento da técnica de RCA para amplificação do genoma completo de *Badnavirus* possibilitará confirmar o status taxonômico de possíveis novas espécies do gênero.

AGRADECIMENTOS

A primeira autora agradece à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Alagoas - FAPEAL pela concessão da bolsa de estudos e pelo auxílio mobilidade discente fornecido (PROCAD-NF) para a realização dos trabalhos nas instituições parceiras.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Andrade GP (2007) Diagnóstico fitossanitário da cultura do inhame (*Dioscorea* spp.) em áreas produtoras do Nordeste do Brasil. Tese de Doutorado, Universidade Federal Rural de Pernambuco. Recife PE, Brasil.
- Asiedu R, Sartie A (2010) Crops that feed the World 1. Yams: Yams for income and food security. *Food Security* 2:305-315.
- Bouhida ML, Lockhart BE, Olszewski NE (1993) An analysis of the complete sequence of a sugarcane bacilliform virus genome infectious to banana and rice. *Journal of General Virology* 74:15-22.
- Bousalem M, Durand O, Scarcelli N, Lebas BSM, Kenyon L, Marchand J-L, Lefort F, Seal SE (2009) Dilemmas caused by endogenous pararetroviruses regarding the taxonomy and diagnosis of yam (*Dioscorea* spp.) badnaviruses: Analyses to support safe germplasm movement. *Archives of Virology* 154:297-314.
- Bridson RW, Phillips S, Brunt A, Hull R (1999) Analysis of the sequence of *Dioscorea alata bacilliform virus*: Comparison to

- others members of the badnavirus group. *Virus Genes* 18:277-283.
- Doyle JJ, Doyle JL (1987) A rapid DNA isolation procedure for small amounts of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin* 19:11-15.
- Eni AO, Hughes JD'A, Rey MEC (2008) Survey of the incidence and distribution of five viruses infecting yams in the major yam-producing zones in Benin. *Annals of Applied Biology* 153:223-232.
- Gayral P, Iskra-Caruana M (2009) Phylogeny of *Banana streak virus* reveals recent and repetitive endogenization in the genome of its banana host (*Musa* sp.). *Journal of Molecular Evolution* 69:65-80.
- Geering ADW, Olszewski NE, Harper G, Lockhart BEL, Hull R, Thomas JE (2005) Banana contains a diverse array of endogenous badnaviruses. *Journal of General Virology* 86:511-520.
- Geering ADW, Hull R (2012) Family *Caulimoviridae*. In: King AMQ, Adams MJ, Carstens EB, Lefkowitz, EJ (Eds.). *Virus Taxonomy*. 9th Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. London UK. Elsevier Academic Press. pp. 429-443.
- James AP, Geijskes RJ, Dale JL, Harding RM (2011) Development of a novel rolling-circle amplification technique to detect *Banana streak virus* that also discriminates between integrated and episomal virus sequences. *Plant Disease* 95:57-62.
- IBGE (2013) Sidra - Sistema IBGE de recuperação automática. Disponível em: <http://sidra.ibge.gov.br>. Acessado em 20 novembro 2013.
- Kenyon L, Lebas BSM, Seal SE (2008) Yams (*Dioscorea* spp.) from the South Pacific Islands contain many novel badnaviruses: Implications for international movement of yam germplasm. *Archives of Virology* 153:877-889.
- Moura RM (2005) Doenças do inhame-da-costa (*Dioscorea cayennensis*). In: Kimati H, Amorim L, Rezende JAM, Bergamin Filho A, Camargo LEA (Eds.) *Manual de Fitopatologia: Doenças das Plantas Cultivadas*. 4ª edição. São Paulo SP. Agronômica Ceres. p.415-419.
- Ndowora T, Dahal G, LaFleur D, Happer G, Hull R, Olszewski NE, Lockhart BEL (1999) Evidence that badnavirus infection in *Musa* can originate from integrated pararetroviral sequences. *Virology* 255:214-220.
- Phillips S, Briddon RW, Brunt A, Hull R (1999) The partial characterization of a badnavirus infecting the greater asiatic or water yam (*Dioscorea alata*). *Journal of Phytopathology* 147:265-269.
- Ronquist F, Huelsenbeck JP (2003) MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19:1572-1574.
- Rossel HW, Thottappilly G (1985) Virus disease of some important food crops in tropical Africa. Ibadan Nigeria. IITA publication series.
- Swofford DL (2003) PAUP*. *Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods)*. Version 4. Sunderland MA, EUA. Sinauer Associates.
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S (2011) MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution* 28:2731-2739.
- Thouvenel JC, Fauquet C (1979) Yam mosaic, a potyvirus infecting *Dioscorea cayennensis* in the Ivory Coast. *Annals of Applied Biology* 93:279-283.
- Thouvenel JC, Dumont R (1990) Yield decreases in yam infected with mosaic virus in Cote d'Ivoire. *L'Agronomie Tropicale* 45:125-129.
- Yang IC, Hafner, GJ, Dale, JL, Harding, RM (2003) Genomic characterisation of taro bacilliform virus. *Archives of Virology*

TPP 588 - Recebido 16 Abril 2012 - Aceito 8 Março 2013
Editor de Seção: Marcos A. Machado