



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM PROTEÇÃO DE
PLANTAS**



JEAN PHELLIPE MARQUES DO NASCIMENTO

**INCIDÊNCIA E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE BADNAVIRUS EM
BANCOS DE GERMOPLASMA DE INHAME (*Dioscorea* spp.) NO BRASIL**

Rio Largo

2014

JEAN PHELLIPE MARQUES DO NASCIMENTO

**INCIDÊNCIA E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE BADNAVIRUS EM BANCOS
DE GERMOPLASMA DE INHAME (*Dioscorea* spp.) NO BRASIL**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós Graduação em Proteção de Plantas do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Alagoas como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Proteção de Plantas.

Orientador(a): Prof. Dra. Iraildes Pereira Assunção

Rio Largo

2014

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico

Bibliotecário Responsável: Valter dos Santos Andrade – CRB-1251

N244i Nascimento, Jean Phellipe Marques do.
Incidência e caracterização molecular de badnavirus em bancos de germoplasma de inhame (*Dioscorea* spp.) no Brasil / Jean Phellipe Marques do Nascimento. - 2014.
54 f. : il.

Dissertação (Mestrado em Proteção de Plantas) – Universidade Federal de Alagoas. Centro de Ciências Agrárias, Rio Largo, 2014.

Bibliografia: p. 51-54.
Inclui anexos.

1. Inhame – Doenças. 2. Badnavirus. 3. Germoplasma vegetal – Banco de dados. 4. Banco de germoplasma – Contaminação. I. Título.

CDU: 633.496:632.38

JEAN PHELLIPE MARQUES DO NASCIMENTO

**INCIDÊNCIA E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE BADNAVIRUS EM BANCOS
DE GERMOPLASMA DE INHAME (*Dioscorea spp.*) NO BRASIL**

Dissertação apresentada ao Curso de
Mestrado em Proteção de Plantas, do Centro
de Ciências Agrárias da Universidade Federal
de Alagoas. Aprovada pela seguinte Banca
Examinadora:

Prof. Dra. Iraildes Pereira Assunção - Universidade Federal de Alagoas (Orientadora)

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Gaus Silvestre de Andrade Lima – Universidade Federal de Alagoas
(Examinador)

Prof. Dr. Roberto Ramos Sobrinho – Bolsista PRODOC/CAPES/UFAL (Examinador)

Rio Largo

2014

Dedico este trabalho aos meus pais Mauro Marques do Nascimento e Elizabete Marques da Silva, pelo amor incondicional e por me ensinar a caminhar com dignidade, caráter e sempre estarem me apoiando na busca dos meus objetivos. Dedico também à minha namorada Murielle Iasminne pois têm sido durante todo este tempo uma pessoa mais que especial em minha vida.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me proporcionar a oportunidade de cumprir os meus objetivos, e pela condição de permanecer até o final;

À minha namorada Murielle Iasminne de Oliveira Silva, pois esteve comigo em mais um momento importante de minha vida, me apoiando, pelo seu carinho, compreensão e grande amor principalmente durante as dificuldades;

Ao meu irmão Edgar Marques do Nascimento, apoio em todos os momentos;

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão de bolsa, essencial para a completa realização do curso e deste trabalho;

A Universidade Federal de Alagoas (UFAL), por meio do Programa de Pós Graduação em Proteção de Plantas do Centro de Ciências Agrárias (CECA);

A minha orientadora Prof (a). Dr. Iraildes Assunção e ao Prof. Dr. Gaus Andrade, pela oportunidade, confiança, amizade, paciência e por todos os ensinamentos durante este período;

Ao Dr. Roberto Ramos Sobrinho pela assistência nas análises dos dados, e o ensinamento durante este momento;

A Dra. Sarah Cavalcanti pela paciência e assistência durante a escrita da dissertação;

A todos os Professores que compõem o curso de mestrado em Proteção de Plantas da Universidade Federal de Alagoas, pelos ensinamentos;

Àos amigos Anderson, Anilde, Lourdes Regina, Rosângela, Nelson, Izael, Fred, Emerson e Andrezo pela amizade, companheirismo, momentos de descontração e diversão;

Aos amigos do Laboratório de Fitopatologia Molecular CECA-UFAL, Jane Cléa, Jaqueline Figueiredo, Edlene, Aline, Mayra Ferro, Lucas Jobim, Lucas Fonseca, Dra. Joyce Lima, Renato Nascimento e Dra. Márcia Carine pelo apoio, amizade e auxílio durante a realização deste trabalho;

Agradeço a todos os pesquisadores responsáveis pelos Bancos de germoplasmas que cederam as amostras de inhame utilizadas neste trabalho.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho, afinal ninguém é forte sozinho!

RESUMO GERAL

A cultura do inhame desempenha grande importância na alimentação em regiões da África, onde são observados altos índices de produção. No Brasil, a região Nordeste destaca-se como principal produtora, onde serve como fonte de alimento e auxília na geração de emprego e renda de muitas famílias. Vários problemas fitossanitários, afetam a cultura do inhame, dentre os quais podemos destacar as viroses. Badnavírus causam doenças em culturas de grande importância econômica, tal como observado em banana e cana de açúcar, e infecções por estes vírus têm sido observadas no inhame em diversas regiões produtoras. Em todo o mundo são relatadas pelo ICTV duas espécies de badnavirus causando infecções em inhame, o *Dioscorea bacilliform alata virus* (DBALV) e o *Dioscorea bacilliform sansibarensis virus* (DBSNV). O gênero *Badnavirus* (família *Caulimoviridae*) engloba vírus de plantas com genoma de DNA circular de fita dupla (dsDNA), replicam por meio de um intermediário de RNA, e possuem a capacidade de integração do seu DNA no genoma do hospedeiro. Este fato é importante pois a descoberta de sequências virais presentes no genoma de plantas de inhame alerta para a maior cautela no que diz respeito ao intercâmbio de germoplasma, evitando assim a disseminação viral. As informações acerca de badnavirus em inhame no Brasil ainda são escassas, portanto são de extrema importância estudos que venham contribuir para uma melhor compreensão da ocorrência e distribuição destes vírus no país. Sendo assim, o objetivo do presente trabalho foi determinar a incidência e caracterizar molecularmente badnavírus em bancos de germoplasma de inhame no Brasil. As amostras de inhame foram obtidas a partir dos bancos de germoplasma da 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 de inhame dos bancos de germoplasmas avaliados foi de 75,3%. As análises de comparações pareadas e filogenética de 42 sequências de nucleotídeos da região da RT/RNase/H revelaram que as duas espécies de badnavírus atualmente aceitas pelo ICTV foram detectadas nos acessos avaliados. Além das espécies espissomais foram encontradas também sequências endógenas que apresentaram porcentagem de identidade de nucleotídeos variando entre 89% a 100% com endogenous *Dioscorea bacilliform virus* (eDBV) dos grupos 9 e 12. Os resultados aqui obtidos corroboram com a hipótese de ampla disseminação do DBALV em áreas produtoras de inhame e registra o primeiro relato do DBSNV infectando inhame no Brasil.

Palavras-chave: *Badnavirus*, inhame, banco de germoplasma, sequências endógenas.

GENERAL ABSTRACT

The culture of yam plays great importance in power in regions of Africa where high production rates are observed. In Brazil, the Northeast stands out as the main producer, which serves as a food source and helps in generating employment and income for many families. Several disease problems, affect the culture of yam, among which we can highlight the viruses. Badnavirus cause diseases in crops of economic importance, such as observed in banana and sugarcane, and infections with these viruses have been observed in yam production in various regions. Worldwide are reported by ICTV two species badnavirus causing infections in yams, *Dioscorea alata bacilliform virus* (DBALV) and *Dioscorea bacilliform virus sansibarensis* (DBSNV). The *Badnavirus* genus (family *Caulimoviridae*) comprises plant genome to double-stranded circular DNA (dsDNA), replicate through an RNA intermediate, and have the capacity to integrate their DNA into the host genome virus. This fact is important since the discovery of viral sequences present in the genome taro alert to the utmost caution as regards the exchange of germplasm, thus preventing viral spread. The information about badnavirus in yam in Brazil are still scarce, so are extremely important studies that may contribute to a better understanding of the occurrence and distribution of these viruses in the country. Thus, the objective of this study was to determine the incidence and molecularly characterize badnavirus in yam germplasm banks in Brazil. The yam samples were obtained from the germplasm collections of the Escola de Agriculture Luiz (ESALQ/USP), Universidade Federal de Viçosa (UFV) and Universidade Federal do Reconcavo Baiano (UFRB). The average incidence of Badnavirus in samples of yam germplasm banks evaluated was 75.3 %. Analyses of paired comparisons and phylogenetic sequences of 42 nucleotides of the RT/RNase/H region revealed that the two species currently accepted by ICTV Badnavirus were detected in the evaluated accessions. Beyond espissomais species were also found endogenous sequences that showed the percentage of nucleotide identity ranging from 89% to 100% with *endogenous Dioscorea bacilliform virus* (eDBV) groups 9 and 12. The findings agree with the hypothesis of widespread dissemination of DBALV yam -producing areas and records the first report of DBSNV infecting yam in Brazil.

Key Word: *Badnavirus*, yam, Germplasm bank, Endogenous sequences.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. (A) Representação esquemática da organização genômica de *Commelina yellow mottle virus* (CoYMV) membro tipo do gênero *Badnavirus*. O círculo completo representa o genoma de DNA de fita dupla. As setas largas indicam a posição das ORFs 1, 2 e 3. (B) Representação linear do mapa genômico de badnavírus mostrando a identificação dos domínios: domínios de movimento (M), motivo de ligação ao RNA (BR), região conservada de cisteína (CYS), aspartato protease (PR), transcriptase reversa (RT), Ribonuclease H (RH) (BRIDDON *et al.*, 1999).....18

Figura 2. Matriz bidimensional representando a porcentagem de identidade de comparações pareadas de sequências nucleotídicas da região RT/RNase/H dos isolados obtidos aqui com espécies de badnavirus disponíveis no GenBank.....28

Figura 3. Árvore filogenética de Máxima Verossimilhança baseada em sequências da região RT/RNase/H de isolados de *Badnavirus* que infectam inhame obtidos neste trabalho e outras espécies disponíveis no GenBank. O *Rice tungro bacilliform virus* (RTBV), gênero *Tungrovirus*, foi utilizado como *outgroup*.....30

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Espécies, acessos e locais de procedência das amostras de inhame utilizadas neste estudo.....21

Tabela 2. Lista dos badnavirus utilizados para as comparações de sequências e análise filogenética, com seus respectivos acrônimos e números de acesso no GenBank.....23

Tabela 3. Incidência de *Badnavirus* em amostras de inhame dos bancos de germoplasma no Brasil.....25

Tabela 4. Isolados utilizados nas análises comparações pareadas e filogenética.....26

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	10
1.1 Aspectos gerais da cultura do inhame.....	10
1.2 Família <i>Caulimoviridae</i>	15
1.3 Gênero <i>Badnavirus</i>	17
1.4 Banco de germoplasma.....	19
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	21
2.1 Obtenção das Amostras.....	21
2.2 Extração de DNA, amplificação da região RT/RNase/H e sequenciamento.....	21
2.3 Comparação de sequências e análises filogenética e de recombinação.....	22
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	25
3.1 Amplificação da região RT/RNase/H e sequenciamento.....	25
3.2 Comparação de sequências e análises filogenética e de recombinação.....	27
4. CONCLUSÕES.....	34
5. REFERÊNCIAS.....	35

1 INTRODUÇÃO

1.1 Aspectos gerais da cultura do inhame

O inhame (*Dioscorea* spp.) é uma planta monocotiledônea, herbácea, trepadeira, de hábito anual ou perene que pertence à família Dioscoreaceae. É constituída de caules delgados a robustos, formando muitas vezes um emaranhado sobre outras plantas, podendo também ocorrer espécies eretas e herbáceas (PEDRALLI, 2002). A cultura do inhame desponta hoje como a quarta cultura de tubérculos e raízes mais importante do mundo, ficando atrás somente da cultura da batata (*Solanum tuberosum* L.), mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) e batata-doce (*Ipomoea batatas* L.) (FAO, 2012).

O gênero *Dioscorea* teve uma ampla dispersão mundial no final do período Cretáceo, de onde evoluiu para diferentes direções no Novo e no Velho Mundo, o que culminou na origem de espécies distintas. Muitas variedades de inhame foram introduzidas na América do Sul por intermédio dos portugueses e espanhóis no século XVI durante a colonização (LEBOT, 2009; SIQUEIRA, 2009). Hoje o inhame é cultivado principalmente na África, mas também está presente na Ásia, partes da América do Sul, bem como Caribe e ilhas do Pacífico Sul (ASIEDU; SARTIE, 2010).

O inhame constitui um dos principais alimentos em regiões tropicais (MAFRA, 1986) e a produção mundial atingiu no ano de 2012 cerca de 57,3 milhões de toneladas (FAO, 2012). A Nigéria destaca-se como o maior produtor (37,0 milhões de t), seguida por Gana (6,6 milhões de t), Costa do Marfim (5,6 milhões de t) e Benin (2,3 milhões de t), enquanto o Brasil ocupa a décima segunda posição (244,1 mil t). Na América Latina, o Brasil é o segundo maior produtor dessa cultura, com uma área colhida de 25 mil ha, ficando atrás apenas da Colômbia (FAO, 2012). A região Nordeste é responsável pela maior produção de inhame no país, com 38,2 mil t, onde os estados da Paraíba, Pernambuco, Alagoas, Bahia e Maranhão destacam-se como os principais produtores dessa Dioscoreaceae na região (IBGE, 2008).

Entre as 600 espécies do gênero *Dioscorea*, estima-se que ocorram no Brasil entre 150 e 200, sendo a maioria pouco estudada (PEDRALLI, 2002). Apenas 10 são cultivadas, por produzirem túberas comestíveis: *Dioscorea alata* L., *D. cayenensis* Lam., *D. rotundata* Poir., *D. esculenta* (Lour) Burk, *D. bulbifera* L., *D. numularia* Lam, *D. pentaphylla* L., *D. hispida* Dennst, *D. trifida* L. e *D. dumetorum* (Kunth) Pax. (ASIEDU; SARTIE, 2010).

O inhame é um produto agrícola de alto valor econômico para os mercados interno e externo, que movimenta e beneficia a economia das zonas produtoras. A importância alimentar do inhame decorre do seu alto valor nutritivo e energético (SANTOS; MACÊDO, 2002), pois é rico em carboidratos e vitaminas do complexo B (MOURA, 2005), vitamina A, ácido ascórbico e grãos de amido. Grande parte da produção de inhame é destinada ao mercado interno e a outra parte é exportada, principalmente para a Europa (SANTOS, 2002). Associado a isso, está o crescimento das exportações do produto, o que aumenta as expectativas e o interesse dos agricultores no cultivo dessa hortaliça, principalmente em função dos melhores preços oferecidos pelos exportadores. No entanto, para que haja retorno econômico da atividade, faz-se necessário estruturar a cadeia produtiva, promover melhoria dos sistemas de produção, da qualidade do produto, oferta constante e preços competitivos, fatores estes que estão associados aos conhecimentos técnicos e tecnologias disponíveis para a condução adequada da cultura (SANTOS, 2002).

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

Embora seja considerada, na maioria dos casos, uma cultura de subsistência, o inhame tem grande importância sócio-econômica no cenário da agricultura familiar no Nordeste do Brasil, com um significativo potencial de desenvolvimento, contribuindo para alimentação humana, beneficiando populações carentes, além de ser fonte de renda para pequenos e médios produtores (SANTOS; MACÊDO, 2002). No entanto, sua produtividade ainda continua baixa, em torno de 11.000 kg/ha decorrente do manejo inadequado da cultura, do uso de túberas-semente de inferior qualidade agrônômica, principalmente em função da indisponibilidade de material de melhor qualidade (SANTOS, 1996; SANTOS et al., 2007).

No mercado brasileiro têm destaque duas cultivares de inhame: Da Costa (*D. cayennensis*), é recomendada para o plantio comercial e é a única exportada, e São Tomé (*D. alata*), plantada em menor escala e menos cultivada na região Nordeste. A cultivar Da Costa é a mais plantada, produzindo túberas com elevado valor econômico (MOURA, 2005; SANTOS et al., 2007).

A cultivar Da Costa é originária do Oeste da África e foi introduzida nas Américas pelos escravos. Apresenta túberas cilíndricas e de tamanho variável, geralmente de 1 a 10 kg (SANTOS, 2002). É bastante plantada em Pernambuco e Paraíba, podendo chegar a 40 t/ha. Há pouco interesse de comercialização no mercado de São Paulo, embora com plena aceitação no mercado nordestino e internacional. Há ocorrência de cultivos comerciais no Agreste e Sertão nordestinos, sob regime de irrigação, com destino ao mercado externo (SIQUEIRA, 2009), sendo os Estados Unidos, Reino Unido, Países Baixos, Canadá e França os principais importadores (MESQUITA, 2002).

A cultivar São Tomé é originária do continente Asiático, possui túberas cilíndricas, com polpa normalmente branca (SANTOS, 1996; SIQUEIRA, 2009). Esta cultivar é pouco cultivada no Nordeste devido a alta susceptibilidade a doenças fúngicas. Os Estados de São Paulo, Minas Gerais, Rio de Janeiro e Espírito Santo são grandes proutores de São Tomé, onde é ainda conhecida por cará, e utilizado para consumo direto e industrializado (MOURA, 2006).

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

Apesar de o inhame ser plenamente adaptado às condições edafo-climáticas do Nordeste brasileiro e ser uma cultura de fácil manejo (MAFRA, 1986), as doenças são limitantes à produção, pois podem reduzir a produtividade e o valor unitário das túberas destinadas ao comércio interno e à exportação (MOURA, 1997; SANTOS, 1996).

A queima das folhas, conhecida também como pinta preta, causada por *Curvularia eragrostidis* (Henn.) J.A. Mey. é responsável por prejuízos elevados à cultura do inhame no Nordeste brasileiro, chegando a reduzir em 35 a 40% o peso das túberas comerciais (EMATER/IPA, 1985; SANTOS, 2002). Quando incide sobre plantas jovens, que possuem folhas em desenvolvimento, o crescimento da hospedeira é afetado e a presença de folhas necrosadas e retorcidas constituem quadro típico de crestamento com nanismo. As perdas, nesses casos, são sempre elevadas. O sintoma secundário ou reflexo é o pequeno tamanho das túberas comerciais e túberas sementes (MOURA, 2005).

A antracnose, causada pelo fungo *Glomerella cingulata* (*Colletotrichum gloeosporioides* Penz.), afeta principalmente a espécie *D. alata*, causando sintomas de manchas foliares de coloração marrom avermelhada nas folhas e caule, que podem coalescer

formando grandes áreas necrosadas e, conseqüentemente, reduzir de forma expressiva a produção de túberas (COELHO, 2002).

As podridões causadas por *Penicillium sclerotigenum* (Yamamoto) e *Rhizopus oryzae* (Went e Prinsen Geerl) afetam túberas em diferentes situações (MOURA, 1987, 2002). A podridão-verde (*P. sclerotigenum*) ocorre durante armazenamento e transporte de túberas de *D. cayennensis* e *D. alata*, sendo a segunda mais resistente (OLIVEIRA et al., 2006). O fungo penetra sempre através de ferimentos (MOURA et al., 1976). A doença é favorecida pelas condições de armazenamento e as perdas, muitas vezes, são elevadas nas exportações. A podridão-aquosa (*Rhizopus oryzae*) ocorre quando túberas-comerciais no solo estão submetidas a ambiente saturado de água, principalmente quando a colheita é retardada, formando-se túberas muito maduras, em épocas chuvosas. Nessas circunstâncias as perdas são sempre altas (MOURA, 1987).

A cultura também pode ser afetada pela rizoctoniose causada por *Rhizoctonia solani* (Kühn), que foi relatada pela primeira vez infectando caule de plantas de inhame no Brasil por Silva et al. (2000).

Um importante problema fitossanitário da cultura do inhame no Brasil é a doença casca preta causada pelos nematóides *Scutellonema bradys* (Steiner e LeHew) Andrassy ou *Pratylenchus coffeae* (Zimmermann) Filipjev e Stekhovem, que incide sobre túberas-comerciais e túberas-sementes. A importância desta doença é justificada pela constante disseminação do patógeno, proporcionada pela permanente comercialização de túberas-sementes contaminadas, e principalmente pelas dificuldades inerentes ao controle (SANTOS, 2007). As túberas sementes também têm alto índice de infestação por *Meloidogyne incognita* (Kofoid e White) Chitwood, *M. javanica* (Treub) Chitwood e *M. arenaria* (Neal) Chitwood, nematóides das galhas de raízes que são responsáveis pela meloidoginose, conhecida vulgarmente por bolba do inhame. No comércio interno, túberas parasitadas por *Meloidogyne* spp. têm o valor unitário reduzido em 50%, em média, e são excluídas nas seleções para exportação. Infestações múltiplas envolvendo um nematóide causador da casca preta e outro da meloidoginose são frequentes (MOURA, 2002; SANTOS, 2007).

As viroses são de particular importância uma vez que este é comercialmente propagado vegetativamente por meio de pequenas túberas ou pedaços de túberas, resultando no acúmulo e perpetuação dos vírus (KENYON et al., 2001; SEAL; MULLER, 2007). A propagação vegetativa, através de túberas-sementes, facilita a sobrevivência, disseminação e o acúmulo de agentes virais em cultivos sucessivos. Como consequência do acúmulo de vírus

no material propagativo, as plantas perdem o vigor e produzem túberas de qualidade reduzida (AMUSA et al., 2003).

Doenças virais no inhame foram inicialmente identificadas em Serra Leoa e em Porto Rico em 1936 (COOK, 1978). Descrições subsequentes de infecção por vírus ocorreram em 1957 (MIEGE, 1957) e em 1961 (ROBERTSON, 1961). Sintomas de mosaico moderado a grave foram posteriormente relatados em *D. rotundata* na Nigéria (TERRY, 1976). Vírus têm sido relatados infectando diferentes espécies de inhame em todas as regiões em que a cultura foi estabelecida (ALEMAN-VERDAGUER et al., 1997; GOUDOU-URBINO et al., 1996; HUGHES, 1997; ODU et al., 2004; PHILLIPS et al., 1999; SEAL; MULLER, 2007; THOUVENEL; FAUQUET, 1979).

Os sintomas associados a doenças causadas por vírus variam dependendo do agente envolvido, mas em geral incluem: clorose foliar severa, mosaico, cordão-de-sapato, clorose internerval, nanismo, distorção foliar, dentre outros. Estes sintomas, que afetam principalmente a folhagem, levam a uma redução na capacidade fotossintética da planta infectada com efeitos deletérios sobre a produção, qualidade das túberas e em algumas situações causam a morte das plantas (THOUVENEL; DUMONT, 1988).

Diversas viroses têm sido descritas na cultura por membros dos gêneros *Potyvirus*, *Badnavirus*, *Cucumovirus* e *Potexvirus*. Destacam-se pela importância e distribuição geográfica os vírus dos gêneros *Potyvirus* (família *Potyviridae*) e *Badnavirus* (família *Caulimoviridae*) (ODU et al., 2006; PHILLIPS et al., 1999; SEAL; MULLER, 2007; YANG et al., 2003). Duas espécies do gênero *Potyvirus* são bem caracterizadas: o *Yam mosaic virus* (YMV) e o *Yam mild mosaic virus* (YMMV). O primeiro foi descrito originalmente na Costa do Marfim (MOURA, 2006), e é considerado o vírus de maior importância econômica para esta cultura (MUNFORD; SEAL, 1997).

O primeiro badnavírus caracterizado em inhame foi um isolado infectando *D. alata* obtido na Nigéria, designado como *Dioscorea alata bacilliform virus* (DaBV) (PHILLIPS et al., 1999). Posteriormente, SEAL; MULLER (2007) em estudos sobre a diversidade molecular de *Badnavirus* que infectam inhame nas ilhas sul do Pacífico, identificaram uma nova espécie: *Dioscorea sansibarensis bacilliform virus* (ENI, et al., 2008; KENYON et al., 2008; SEAL; MULLER, 2007).

Atualmente apenas duas espécies de badnavírus que infectam *Dioscorea* spp. são reconhecidas pelo ICTV: *Dioscorea bacilliform AL virus* (DBALV) e *Dioscorea bacilliform SN virus* (DBSNV), provenientes de *D. alata* e *D. sansibarensis*, respectivamente (GEERING; HULL, 2012). No entanto, estudos realizados na África e Sul do Pacífico

sugerem alta diversidade de *Badnavirus* em inhame e a possível presença de até doze espécies (ENI et al., 2008). O DBALV causa distorção foliar severa e é o badnavírus mais amplamente distribuído, sendo encontrado em infecções simples e/ou mistas com potyvírus (PIO-RIBEIRO et. al., 2005; YANG et al., 2003).

1.2 Família *Caulimoviridae*

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 (FAUQUET *et al.*, 2005; GEERING; HULL, 2012), são classificados como pararetrovírus (vírus de DNA que utilizam a transcriptase reversa no ciclo de replicação) e que são diferentes dos retrovírus por possuírem seu genoma de DNA e por se integrarem de forma irregular dentro do genoma do hospedeiro não sendo necessário a integração para a replicação (TEMIN, 1985). Os vírus dessa família apresentam suas partículas não envelopadas e podem ser de morfologia isométrica ou baciliforme, onde as partículas isométricas apresentam 50-52 nm de diâmetro, enquanto as partículas baciliformes (30 nm de diâmetro e 130 -150 nm de comprimento) (GEERING; HULL, 2012). O genoma possui uma região intergênica poli A, que em alguns casos pode estar ausente, e também possui descontinuidades de fita simples ou gaps em sítios específicos localizados em ambas as fitas (HARPER *et al.*, 2002). O genoma dos caulimovírus varia quanto a quantidade de ORFs (*Open Reading Frame* - sequências de leitura aberta), podendo ser encontrada de uma a oito, sendo a sua organização genômica uma das principais características utilizadas para distinguir os diferentes gêneros incluídos nessa família.

Os critérios adotados para divisão dos gêneros pertencentes a esta família estão relacionados com o inseto vetor, gama de hospedeiro, organização do genoma e relacionamento filogenético. De acordo com o *International Committee on Taxonomy of Viruses* (ICTV), são reconhecidos sete gêneros pertencendo a família *Caulimoviridae*; *Badnavirus*, *Caulimovirus*, *Cavemovirus*, *Petuvirus*, *Solendovirus*, *Soymovirus* e *Tungrovirus*. Membros desta família são encontrados amplamente distribuídos geograficamente, e as espécies dos gêneros *Tungrovirus* e *Badnavirus* em sua grande maioria estão localizadas nas regiões tropicais e subtropicais (GEERING; HULL, 2012).

Plantas Angiospermas (Monocotiledôneas e Dicotiledôneas) constituem os hospedeiros naturais de espécies da família *Caulimoviridae*, que a depender do gênero, pode ter sua transmissão natural por meio do inseto vetor (Aleyrodidae, Aphididae, Cicadellidae e

Pseudococcidae: ordem Hemiptera) ou por meio do contato entre plantas hospedeiras, transmissão por sementes ou ainda através do pólen e por propagação vegetativa. Transmissão via técnicas de inoculação mecânica e enxertia também podem ocorrer (FAUQUET et al., 2005).

A variedade de sintomas causados por badnavírus é grande, destacando-se mosaico, clareamento de nervuras, clorose entre nervuras e estrias, todos eles relacionados à espécie viral em questão, ao hospedeiro e também às condições climáticas (GEERING; HULL, 2012).

A replicação dos caulimovírus, no seu hospedeiro inicia com a transcrição do RNA a partir do DNA viral no núcleo seguido de transcrição reversa do RNA formado para gerar dsDNA (DNA fita dupla) no citoplasma. No genoma desses vírus há a presença de uma sequência complementar ao tRNAMet da planta, ao qual atribui a função de ser um sítio de iniciação da replicação do DNA, e este sítio pode estar localizado dentro ou adjacente à região intergênica (região não-codificante) e é geralmente conhecido como nucleotídeo 1 (DE KOCHKO et al., 1998).

Diferente do observado nos retrovírus, os pararetrovírus vegetais não se integram ao genoma do hospedeiro para se replicar, não sendo necessário então o genoma destes vírus codificar a proteína integrase. Sequências virais podem estar presentes de maneira dispersa no genoma de plantas hospedeiras, sendo estas originárias de uma infecção viral anterior, e são conhecidas como sequências endógenas de pararetrovírus (*Endogenous Pararetroviral Sequences* - EPRVs), além do fato de ser uma classe abundante de sequências virais endógenas em diferentes espécies de plantas (GAYRAL; ISKRA-CARUANA, 2009).

EPRVs de membros da família *Caulimoviridae* cada vez mais tem sido identificadas estando presente no genoma de muitas espécies de plantas hospedeiras para estes vírus (GEERING; SCHARASCHKIN; TEYCHENEY, 2010). Estas EPRVs caracterizam-se por apresentar 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 ser ativadas ocasionando liberação do genoma viral funcional que causará infecção no hospedeiro (GAYRAL; ISKRA-CARUANA, 2009).

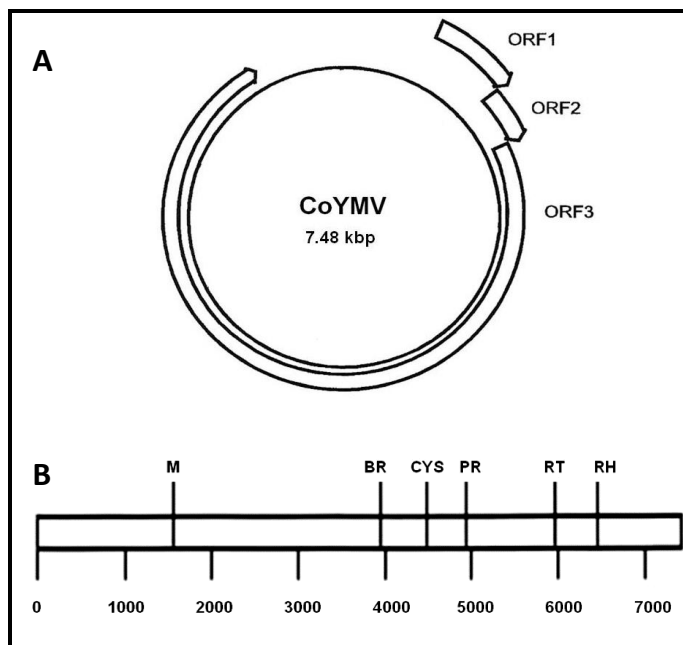
Alguns estudos apontam a capacidade destas EPRVs iniciarem um evento de infecção sob determinadas condições tais como cultura de tecidos e outros fatores de estresse (DAHALL et al., 2000; DALLOT et al., 2001), como observado em *Banana streak OL virus* (BSOLV) (NDOWORA et al., 1999), *Banana streak GF virus* (BSGFV) (GAYRAL; ISKRA-CARUANA, 2009), *Petunia vein clearing virus* (PVCV) (STAGINNUS; RICHERT-PÖGGELER, 2006) e *Tobacco vein clearing virus* (TVCV).

1.3 Gênero *Badnavirus*

De todos os membros da família *Caulimoviridae*, o gênero *Badnavirus* apresenta-se como o mais numeroso e caracteriza-se por apresentar partículas baciliformes com 95-130 nm de comprimento e 24-35 nm de diâmetro (FAUQUET et al., 2005), seu genoma contém uma única molécula dsDNA com tamanho aproximado de 7200-7600 pb, formando um círculo aberto que é interrompido por descontinuidades sítio-específicas e que pode conter uma região intergênica poli A (MEDBERRY; LOCKHART; OLSZEWSKI, 1990). Dos gêneros de vírus que causam doenças em plantas, *Badnavirus* é o segundo maior dentre os que possuem genoma composto por DNA, superado apenas pelos *Begomovirus* (BOUHIDA; LOCKHART; OLSZEWSKI, 1993; HAGEN et al., 1993).

Commelina yellow mottle virus (CoYMV) é a espécie tipo deste gênero, sendo obtida de *Commelina diffusa* Burm. F., em Guadalupe (MIGLIORI, 1978). Os badnavírus codificam para três principais ORFs (Figura 1A), e contém geralmente três descontinuidades (gaps) em sítios específicos (BOUHIDA; LOCKHART; OLSZEWSKI, 1993; HAGEN et al., 1993; HARPER; HULL, 1998). As ORFs I e II permanecem com suas funções desconhecidas, no entanto, sabe-se que a proteína da ORF I do CoYMV está relacionada com vírions imaturos, enquanto que a ORF II é relacionada tanto a vírions imaturos como maduros (CHENG; YANG; YEH, 1996). A ORF3 codifica uma poliproteína, e esta contém domínios funcionais rico em cisteína (CYS), motivo de ligação ao RNA (RB), aspartato protease (PR), e replicase viral [transcriptase reversa, (RT) e ribonuclease, (RH)] (Figura 1B), todos idênticos para os membros da família *Caulimoviridae* (MEDBERRY; LOCKHART; OLSZEWSKI, 1990; LACO; BEACHY, 1994; HARPER; HULL, 1998).

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



Badnavirus são relatados em uma ampla gama de culturas hospedeiras, muitas das quais economicamente importantes tais como o arroz (*Oryza sativa* L.) (OMURA *et al.*, 1983), a cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.) (LOCKHART; AUTREY, 1988), banana (*Musa* spp.) (LOCKHART; OLSZEWSKI, 1993), cacau (*Theobroma cacao* L.) (BRUNT *et al.*, 1996), citros (AHLAWAT *et al.*, 1996), pimenta (LOCKHART *et al.*, 1997), inhame (*Dioscorea* spp.) (PHILLIPS *et al.*, 1999) e o taro (*Colocasia esculenta* (L.) Schott.) (YANG *et al.*, 2003). O vetor responsável pela transmissão de espécies do gênero *Badnavirus* são cochonilhas *Planococcus citri* (Hemiptera: Pseudococcidae) e a detecção do vírus pode ocorrer em plantas exibindo sintomas ou em plantas assintomáticas (GAUHL; PASBERG-GAUHL; HUGHES, 1997).

A identificação de badnavírus é feita por meio de amplificação parcial do genoma utilizando a técnica de PCR (“*Polymerase Chain Reaction*” = Reação em cadeia da Polimerase), sendo que esta técnica é limitada, pois não é capaz de distinguir entre sequências integradas ao genoma e cópias episomais dos vírus na planta hospedeira (BOUSALEM *et al.*, 2009).

Uma característica comum para diferentes badnavírus é a grande variabilidade presente no seu genoma. Diante disso, a maioria dos pares de *primers* para PCR utilizados para sua detecção foram desenhados a partir de três regiões conservadas que estão presentes na ORF III (MEDBERRY; LOCKHART; OLSZEWSKI, 1990), das quais representam o domínio tRNAMet e as regiões da RNase H e RT (LOCKHART; OLSZEWSKI, 1993; GEERING et al., 2000). A alta variabilidade genética apresentada por badnavírus, bem como a descoberta da integração de *Banana streak virus* (BSV) no genoma da planta, demonstra que ainda há muitas limitações e dificuldades no que diz respeito a testes confiáveis de diagnóstico, o que acarreta em dificuldades para o intercâmbio internacional de germoplasma. A integração de partes do genoma de BSV em espécies de *Musa* foi primeiramente apontado por Lafleur; Lockhart e Olszewski (1996) através de hibridização, e demonstrado adicionalmente por técnicas moleculares e citogenéticas por Harper et al. (1999). Geering et al. (2000) sugerem que sequências integradas de BSV podem estar ligadas ao genoma A ou B de *Musa* e que a distribuição dos integrantes de BSV podem estar restritos a determinadas espécies do hospedeiro, pois uma infecção em banana pode ser originada a partir de sequências integradas de badnavírus (NDOWORA et al., 1999).

1.4 Bancos de germoplasma

Dentro de uma espécie é possível observar a presença de variações que podem ser decorrentes de ações do ambiente, ou então devido a diferenças genéticas. Para estudos que envolvem melhoramento de plantas, a variação genética constitui um componente de extrema importância (BESPALHOK et al., 2007).

Os genótipos de uma espécie são responsáveis por fornecer fonte de variabilidade disponível para o melhoramento genético de plantas, e pode ser definido como um germoplasma (RONZELLI-JUNIOR, 1996). O local onde os germoplasmas estão armazenados são os bancos de germoplasmas (BG).

Bancos de germoplasma podem ser definidos como os locais que possuem as condições necessárias para a conservação e preservação dos recursos genéticos de uma determinada espécie vegetal (FAO, 2013). Suas atividades envolvem a aquisição de material genético (intercâmbio, coleta, criação e doação), regeneração e multiplicação dos materiais genéticos, caracterização e documentação dos acessos, conservação e monitoramento das coleções, além da distribuição de material (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, 2014).

Segundo Martin (2002) os BGs tem como objetivo preservar a diversidade dos recursos genéticos das espécies cultivadas e suas espécies relacionadas, bem como corrigir a uniformidade gerada por práticas de melhoramento, que tem levado à redução na base genética das plantas cultivadas, tornando-as mais expostas frente ao ataque de patógenos para o qual não possuem resistência.

A depender de sua função, é possível distinguir dois tipos de BG: os bancos base e os bancos ativos. Bancos base objetivam a preservação dos recursos (coleção de base) por um longo período de tempo (tempo superior a 50 anos), enquanto bancos ativos tem por objetivo reunir e intercambiar material, regenerar, caracterizar e conservar os recursos fitogenéticos, visando a disponibilidade de germoplasma e informações de qualidade para fitomelhoradores e/ou outros usuários (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, 2014). Bancos de germoplasma para as mais diversas culturas de importância econômica estão disponíveis em todo o mundo, e nele podem ser encontradas informações que auxiliam pesquisadores e produtores.

Para a cultura do inhame o Instituto Internacional de Agricultura Tropical (IITA) localizado na Nigéria, e responsável por pesquisas direcionadas ao inhame, possui a maior coleção de germoplasma de *Dioscorea* spp. no mundo, onde possui mais de 3000 acessos, dos quais muitos oriundos da própria região. A coleção possui acessos de 8 espécies: *D. rotundata* (67%), *D. alata* (25%), *D. dumetorum* (1.6%), *D. cayenensis* (2%), *D. bulbifera* (2%), *D. mangelotiana* (0.25%), *D. esculenta* (0.7%) e *D. praehensilis* (0.3%) (IITA, 2010). Devido à grande importância de plantas da família Dioscoreaceae para as regiões da África, o IITA busca o desenvolvimento de novas variedades de inhame com características agronômicas desejadas e com qualidade, bem como melhorar os sistemas de cultivo em busca de atender a demanda da região (IITA, 2010).

A produção de inhame no campo tem sido altamente limitada em função da ocorrência de doenças causadas por fungos, nematoides, bactérias e vírus. De todos, os vírus são particularmente importantes pois, além de causar redução significativa na produção de tubérculos e interferir na sua qualidade, eles restringem o intercâmbio internacional de germoplasma (ASALA et al., 2012). Estudos com o objetivo de investigar a presença de vírus em acessos de inhame, e as implicações de sua presença no que diz respeito à troca segura de germoplasmas têm sido descritos na literatura (KENYON et al., 2008; BOUSALEM et al., 2009). Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi determinar a incidência de *Badnavirus* em amostras de inhame em bancos de germoplasmas no Brasil através de PCR e caracterizá-los por meio do sequenciamento da região RT/RNase/H.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Obtenção das Amostras

Amostras de inhame foram obtidas a partir dos 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) (Tabela 1).

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

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
Universidade Federal de Viçosa - UFV	<i>Dioscorea alata</i>	10
Universidade Federal do Recôncavo Baiano - UFRB	<i>Dioscorea rotundata</i>	4
Universidade Federal do Recôncavo Baiano - UFRB	<i>Dioscorea alata</i>	12
Universidade Federal do Recôncavo Baiano - UFRB	<i>Dioscorea trifida</i>	2

2.2 Extração de DNA, amplificação da região RT/RNase/H e sequenciamento

A extração do DNA total foi feita a partir da utilização de 100 a 200 mg de tecido foliar provenientes de plantas de inhame de acordo com protocolo descrito por Doyle & Doyle, 1991. Alíquotas de DNA foram utilizadas para as reações de amplificação por PCR (*Polymerase Chain Reaction*). Os dois oligonucleotídeos utilizados neste trabalho foram BadnaFP (5'ATGCCITTYGGIITIAARAAYGCICC-3') e BadnaRP (5'CCAYTTTRCAIACISCICCCCAICC-3') (Yang et al., 2003), os quais amplificam região

genômica compreendendo os domínios RT/RNase/H da ORF 3 do genoma de vários badnavírus já descritos.

Foram realizadas reações iniciais em volume total de 15 µL para avaliar a presença ou ausência de badnavírus. As amostras com resultados positivos foram então submetidas novamente a PCR desta vez com 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, 0,2 µL de Taq DNA Polimerase (1U), 1 µL de DNA (10 a 100 ng) e 40,2 µL de água ultrapura. As condições de amplificação foram: desnaturação inicial a 94°C por 4 min, seguida de 94°C por 30 s, 50°C por 30 s e 72°C por 30s. Os ciclos foram repetidos 35 vezes exceto para o passo inicial e a extensão final a 72°C por 10 min. Após a reação de amplificação, uma alíquota dos produtos de PCR foi aplicada em gel de agarose a 1,2% e submetidos à eletroforese em tampão TAE (Tris-Ácido acético, EDTA 0,5M pH 8,0) por aproximadamente uma hora. Após, o gel foi corado com brometo de etídeo e visualizado sob luz ultravioleta. Os produtos de PCR foram purificados utilizando o kit GFX[™] PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare) e enviados para serem sequenciados na Macrogen Inc. (Seul, Coréia do Sul).

2.3 Comparação de sequências, análise filogenética e de recombinação

As sequências foram inicialmente editadas usando o programa CodonCode Aligner (CodonCode Corporation®) para gerar a sequência consenso de cada um dos nossos isolados. Posteriormente, as sequências obtidas foram então submetidas ao algoritmo BLASTn (Nucleotide Basic Local Alignment Search Tool) (ALTSCHUL et al., 1990).

Foram feitas comparações pareadas entre as sequências obtidas e sequências de badnavírus disponíveis no GenBank (Tabela 2) com auxílio da ferramenta Species Demarcation Tool, v. 1.0 (SDT) (MUHIRE et al., 2013), e estimada a percentagem de identidade das sequências de nucleotídeos entre os isolados. Obedecendo aos critérios do ICTV para delimitação de espécies dentro do gênero *Badnavirus*, onde diferenças entre as sequências na região RT/RNase/H maiores que 20%, indicam para vírus de espécies distintas (GEERING; HULL, 2012).

Tabela 2. Lista dos badnavirus utilizados para as comparações de sequências e análise filogenéticas, 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

As sequências foram alinhadas utilizando o algoritmo MUSCLE (EDGAR, 2004), implementado no software MEGA 5 (*Molecular Evolutionary Genetics Analysis*) (TAMURA et al., 2011) e submetidas à análise filogenética de Máxima Verossimilhança (MV) (RIDLEY, 2006) utilizando-se o modelo de substituição de nucleotídeos *General Time Reversible* com distribuição gama (GTR+G). A confiabilidade da árvore gerada foi obtida a partir de análise bootstrap com 1000 repetições.

Análise para detectar eventos de recombinação e possíveis sequências parentais foi realizada utilizando-se o software RDP v.4.36 (*Recombination Detection Program*) (MARTIN; RYBICKI, 2000).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Amplificação da região RT/RNase/H e sequenciamento

Um total de 235 amostras foram analisadas das quais 177 foram PCR positivas para badnavírus, com a amplificação de um fragmento de aproximadamente 580pb e isto representou uma incidência média de 75,3%. Amostras a partir do banco de germoplasma da UFRB apresentaram maior incidência (87,5%) (Tabela 3).

Tabela 3. Incidência de *Badnavirus* em amostras de inhame dos Bancos de germoplasma do Brasil.

Banco de germoplasma	Nº amostras testadas	Amostras PCR positivas	Incidência de badnavirus
ESALQ/USP	169	129	76,3%
Universidade Federal de Viçosa/UFV	50	34	68%
Universidade Federal do Recôncavo Baiano/UFRB	16	14	87,5%

Do total de amostras amplificadas para badnavírus, 113 amostras compreendendo os três locais de procedência (ESALQ/USP, UFV e UFRB) foram enviadas para sequenciamento, um total de 42 sequências foram obtidas (Tabela 4).

Foi observada alta incidência de badnavirus nos três bancos de germoplasma avaliados. Estes resultados corroboram os encontrados por Lima et al., (2013), que observaram 93,7% de incidência de badnavírus ocorrendo em plantios comerciais de inhame na região Nordeste do Brasil. Em ambos estudos a avaliação da incidência foi realizada com base em PCR, técnica que apesar de não ser capaz de discriminar sequências de badnavírus integradas ao genoma da planta das sequências episomais, constitui-se em uma ferramenta de uso rotineiro para detecção dos vírus desse gênero (DELANOY et al., 2003). Portanto, deve-se considerar que esta elevada incidência encontrada pode não demonstrar o que ocorre na realidade. Por exemplo, uma alta incidência (81%) foi observada quando realizada a indexação de *badnavirus* via PCR em genótipos de inhame do banco de germoplasma do

Tabela 4. Isolados utilizados nas análises comparações pareadas e filogenética.

Espécie	Hospedeiro	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

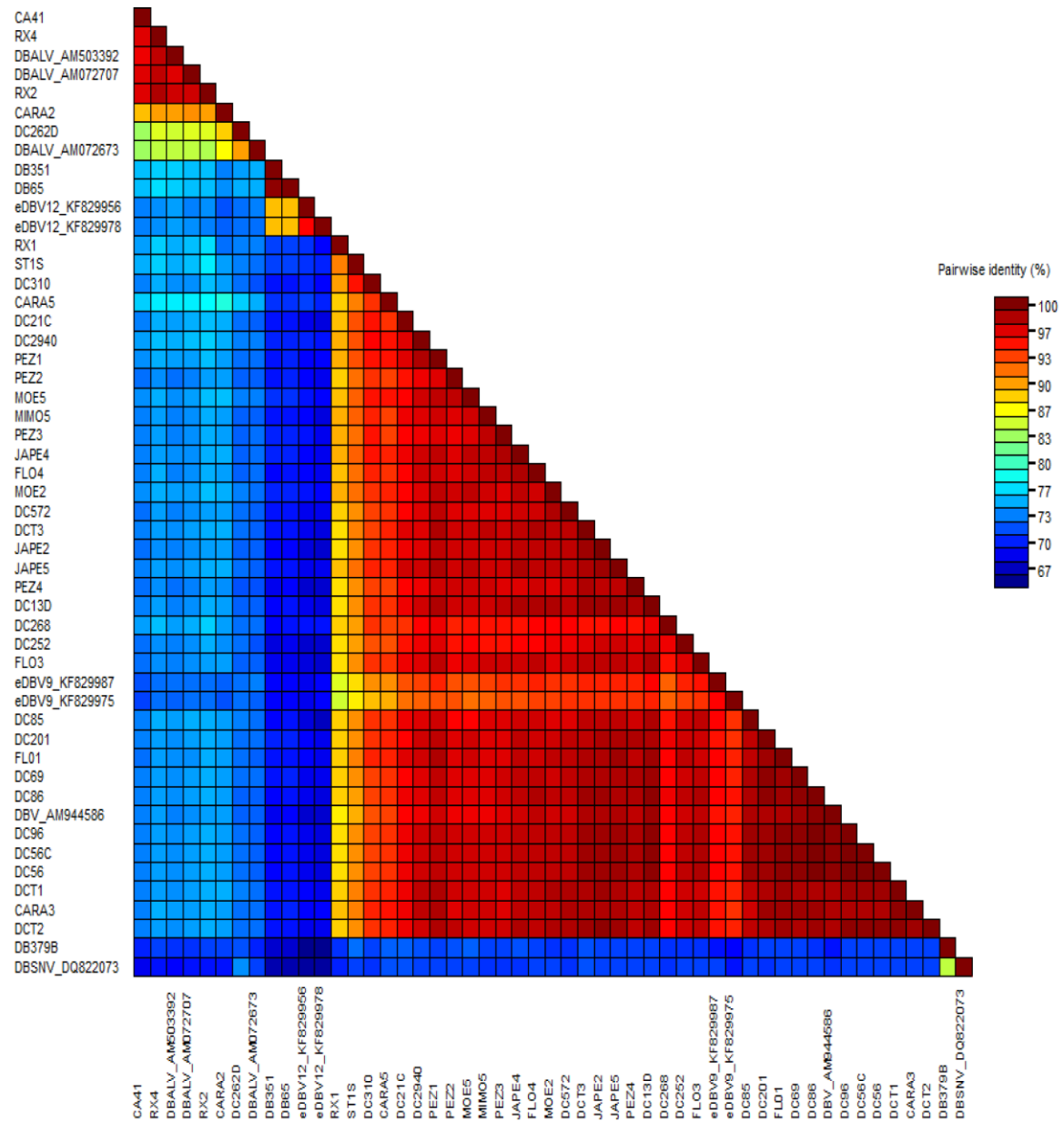
*ESALQ/USP - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz/Universidade de São Paulo; UFV - Universidade Federal de Viçosa; UFRB - Universidade Federal do Recôncavo Baiano.

Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique Pour le Développement - CIRAD. Entretanto quando o mesmo grupo de amostras foi indexado para badnavirus via PAS-ELISA, foi detectada apenas 60% de incidência, demonstrando que o PCR amplificou sequências endógenas além das sequências episomais (SEAL et al., 2014). Para evitar a detecção de sequências endógenas, Silveira et al. (2008) realizaram a indexação biológica de *Banana streak virus* (BSV) via transmissão por colchonilha em acessos de bananeira do banco de germoplasma da Embrapa Mandioca e Fruticultura. Os resultados demonstraram uma incidência de apenas 20% a qual é bem menor que 87,5% determinada por PCR (SILVEIRA et al., 2008; SANT'ANA, 2013). Este resultado pode ser explicado em decorrência de uma baixa eficiência na taxa de transmissão realizada pelo inseto vetor

3.2 Comparação de sequências, e análise filogenética e de recombinação

Análise de comparações de sequências par-a-par revelaram que cinco sequências descritas neste trabalho apresentaram identidade de 83-98% (Figura 2) com isolados de *Dioscorea bacilliform AL virus* (números de acessos AM503392, AM072707 e AM072673), utilizando o critério para demarcação de espécies estabelecido pelo ICTV, enquanto que 36 sequências apresentaram identidade de 89-100% (Figura 2) com sequências de badnavirus endógenos (EPRVs) ou também chamados de *endogenous Dioscorea bacilliform virus* (eDBV) conforme nomenclatura proposta por Staginnus et al., (2009). Destas sequências, 34 apresentaram identidades com eDBVs do grupo 9 (número de acesso KF829987 e KF829975) conforme classificação proposta por Kenyon et al. (2008), e com um isolado de *Dioscorea bacilliform virus* (DBV – número de acesso AM944586), enquanto que duas possuíram identidades com eDBVs do recém criado grupo 12 (proposto por UMBER et al. 2014), cujo os números de acesso são KF829956 e KF829978 (Figura 2). Foi observado ainda que a sequência DB379B, obtida a partir de amostras de *Dioscorea bulbifera* apresentou identidade de 85% (Figura 2) com *Dioscorea bacilliform sansibarensis virus* (DBSNV - número de acesso no Genbank DQ822073) já relatado infectando inhame na África (SEAL; MULLER, 2007). Este constitui o primeiro relato de DBSNV no Brasil, uma vez que trabalhos realizados até então haviam relatado a espécie DBALV como prevalente (ANDRADE, 2007; LIMA et al. 2013).

Figura 2. Matriz bidimensional representando a porcentagem de identidade de comparações pareadas de sequências nucleotídicas da região RT/RNase dos badnavirus deste estudo com outras espécies de badnavirus disponíveis no GenBank.



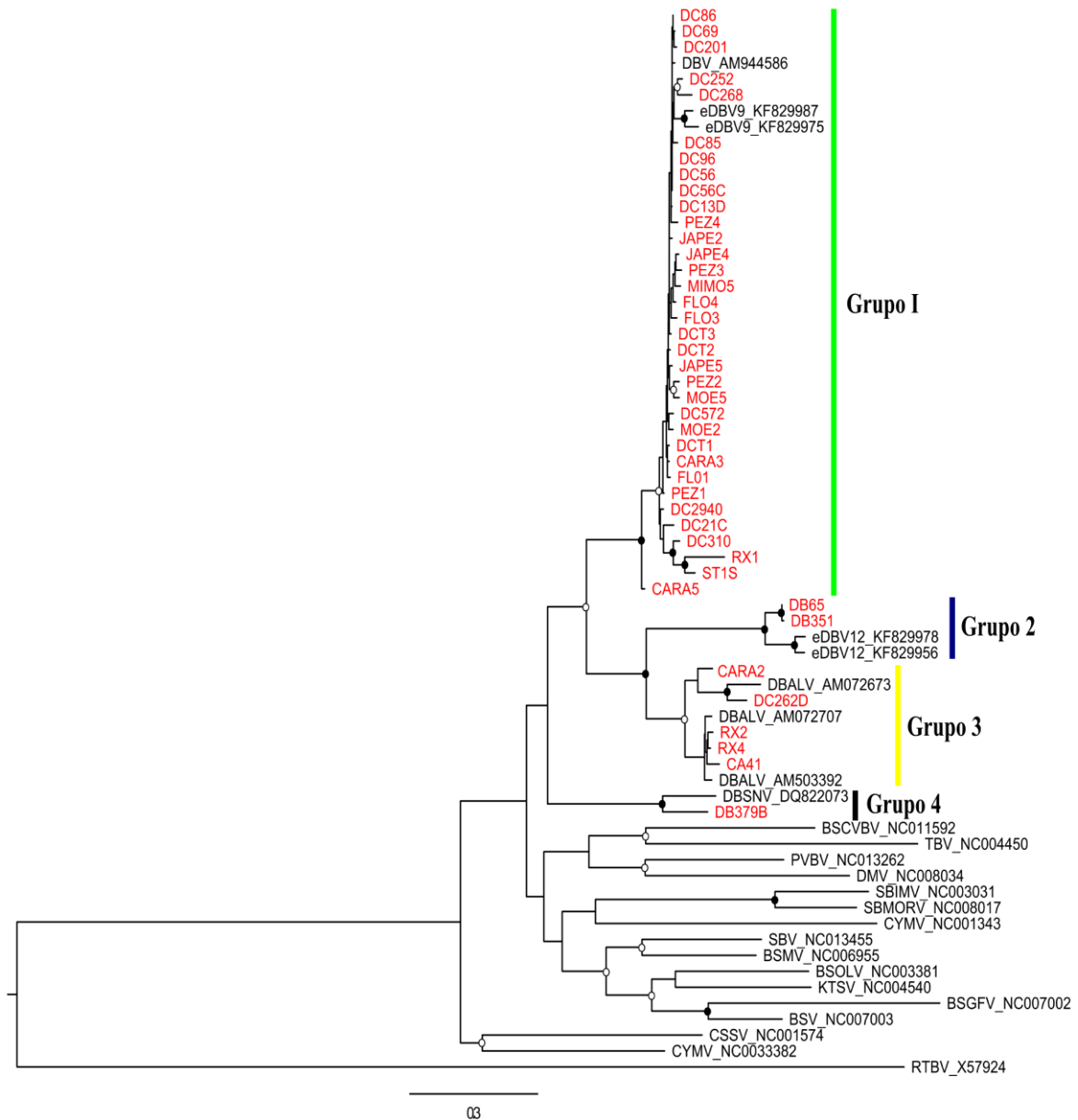
Os resultados da análise filogenética mostraram que 42 isolados descritos aqui formaram quatro grupos distintos. No grupo I 34 isolados obtidos de *D. cayenensis* e *D. alata* procedentes dos bancos de germoplasma da ESALQ/USP e UFV, respectivamente, agruparam com badnavirus endógenos do grupo 9 (eDBV9) (KENYON *et al.* 2008) e com um isolado de DBV (Figura 3). No grupo II, apenas dois isolados oriundos da espécie *D. bulbifera* obtidos do banco de germoplasma da ESALQ/USP agruparam-se com isolados de badnavírus endógenos do recém criado grupo 12 (eDBV12) (Figura 3) (UMBER *et al.* 2014).

No grupo III, cinco isolados obtidos de *D. alata* e *D. cayenensis* procedentes dos três bancos de germoplasma foram agrupados com três isolados de DBALV (Figura 3), uma espécie já relatada infectando inhame no Brasil (ANDRADE, 2007), enquanto que no grupo IV um isolado obtido de *D. bulbifera* procedente do banco de germoplasma da ESALQ/USP agrupou com o DBSNV (Figura 3), uma espécie até então não relatada no Brasil.

As duas espécies de badnavírus (DBALV e DBSNV infectando inhame) atualmente aceitas pelo ICTV foram encontradas nos acessos dos bancos de germoplasma avaliados.

O primeiro relato de DBALV em inhame no Brasil foi realizado por Andrade (2007) nos estados da Bahia e Pernambuco. Posteriormente, um estudo sobre a variabilidade genética de badnavirus que ocorrem em *Dioscorea spp.* provenientes de áreas produtoras dos estados de Alagoas, Paraíba e Pernambuco, sugeriram que DBALV seria a única espécie de badnavírus ocorrendo em inhame na região Nordeste do Brasil (LIMA *et al.*, 2013; GUIMARÃES, 2013). Nessa região, DBALV foi detectado em *D. alata* e *D. cayenensis*, encontrando-se amplamente distribuído e sua prevalência devendo-se provavelmente à proximidade das áreas de cultivo e constante troca de material propagativo (túberas infectadas) entre as áreas (LIMA *et al.*, 2013). Pesquisas sobre incidência e distribuição de vírus que infectam inhame em países da África e Sul do Pacífico revelaram que DBALV também é a espécie prevalente de badnavírus nas áreas de plantio comercial dessa cultura (BOUHIDA *et al.*, 1993; ENI *et al.*, 2008; KENYON *et al.*, 2008; BOUSALEM *et al.*, 2009; ASALA *et al.*, 2012; TOUALY *et al.*, 2014).

Figura 3. Árvore filogenética de Máxima Verossimilhança baseada em sequências da região RT/RNase de isolados de *Badnavirus* que infectam inhame obtidos neste trabalho e outras espécies de *Badnavirus* disponíveis no GenBank. O *Rice tungro bacilliform virus* (RTBV), gênero *Tungrovirus*, foi utilizado como outgroup.



O isolado DB359, obtido de *D. bulbifera* proveniente do banco de germoplasma da ESALQ/USP pertence à espécie DBSNV. Esta espécie foi inicialmente descrita em *D. sansibarensis* apresentando sintomas de deformação foliar e clorose, em Benin, África (SEAL; MÜLLER, 2007). Posteriormente, o DBSNV foi encontrado também infectando espécies de *D. alata* e *D. rotundata* na Nigéria, Gana, Togo e Benin (ENI et al. 2008). Este constitui o primeiro relato de DBSNV infectando inhame no Brasil, uma vez que trabalhos

realizados até então apontaram apenas a ocorrência da espécie DBALV nas áreas de cultivo de inhame no país (ANDRADE, 2007; LIMA et al., 2013; GUIMARÃES, 2013). Este também constitui o primeiro relato de DBSNV na hospedeira *D. bulbifera*, sugerindo que assim como DBALV, a espécie DBSNV não possui espécies hospedeiras específicas.

Apesar do ICTV reconhecer apenas DBALV e DBSNV como as únicas espécies de badnavírus em inhame, estudos baseados em PCR indicam que a diversidade desses badnavírus na África e Sul do Pacífico é alta, sugerindo a ocorrência de ao menos 10 outras espécies infectando *Dioscorea* spp. (KENYON et al., 2008; BOUSALEM et al., 2009). Esta alta diversidade deve-se em parte a presença de um grande número de espécies de inhame nas áreas de cultivo, a exemplo *D. alata*, *D. cayenensis*, *D. rotundata*, *D. sansibarensis* na África e *D. bulbifera*, *D. dumedorum*, *D. numularia* e *D. penthaphylla* no sul do Pacífico (PHILLIPS et al., 1999; ENI et al., 2008; KENYON et al., 2008; BOUSALEM et al., 2009). Além disso, esta grande diversidade também pode refletir a alta variabilidade dentro das espécies dos badnavírus de inhame. Por exemplo, a frequência de mutação estimada para populações de DBALV provenientes do Nordeste do Brasil é em torno de 10^{-4} , semelhante àsquelas encontradas para outros vírus com genoma de DNA e RNA (GUIMARÃES, 2013).

Os demais isolados obtidos neste estudo demonstraram alta identidade com sequências de badnavírus endógenos (eDBV), dos quais 34 isolados agruparam com eDBVs do grupo 9 (KENYON et al., 2008) e com um isolado de *Dioscorea bacilliform virus* – DBV do Benin (número de acesso AM944586), enquanto que dois isolados agruparam com eDBVs do recém criado grupo 12 (UMBER et al., 2014). O isolado de DBV (BN4dr/AM944586) utilizado neste estudo foi descrito por Eni et al., (2008) como sendo membro de uma possível nova espécie de badnavirus que infecta inhame em regiões da África ocidental, e posteriormente foi agrupado como pertencendo a eDBVs do grupo 9 conforme classificação definida por Kenyon et al., (2008). Portanto, para a correta classificação dessas sequências como eDBVs integradas no genoma do inhame ou sequências episomais, testes adicionais como PAS-ELISA, ISEM e Southern Blotting (SEAL et al., 2014) devem ser realizados para confirmar precisamente 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 variada gama de famílias de plantas das quais podem ser citadas banana, petúnia, arroz e tabaco (GEERING et al., 2010; ISKRA-CARUANA et al., 2010). Para espécies da família *Dioscoreaceae* relatos destas sequências integradas em seu genoma ainda são escassos. A análise de sequências de amostras de inhame obtidas na região

do sul do Pacífico, indicaram uma possível presença de sequências integradas em genomas de inhame (KENYON et al., 2008). Bousalem et al. (2009) analisaram 121 sequências provenientes de inhame obtidos de regiões do Caribe, América do Sul e África e detectaram presença de 12 diferentes espécies dentro do gênero *Badnavirus*, admitindo-se também a possibilidade da presença de EPRVs no genoma das espécies utilizadas no estudo. Recentemente foi realizada a confirmação e caracterização de sequências endógenas de badnavirus do inhame (eDBV) integradas no genoma de espécies de inhame pertencentes ao complexo *D. cayenensis-rotundata* (SEAL et al., 2014; UMBER et al., 2014). 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 (CHABANNES et al., 2013), pois a maioria das EPRVs que foram identificados até então são considerados como não infecciosos (CHABANNES; ISKRA-CARUANA, 2013; GEERING et al., 2010). Há ainda relatos de que EPRVs podem conferir vantagens ao seu hospedeiro, fornecendo resistência aos seus vírus cognatos (HULL et al., 2000; ISKRA-CARUANA et al., 2014; NOREEN et al., 2007). A detecção confiável de espécies de badnavírus de inhame representa um desafio, uma vez que é necessário utilizar ferramentas que venham a distinguir sequências epissomais das sequências integradas. A técnica de PCR, bem como a abordagem sorológica tem sido amplamente utilizadas como testes para detecção de badnavirus em amostras de inhame (ENI et al., 2008; ENI et al., 2013; ASALA et al., 2012; TOUALY et al., 2014). Contudo, não podem ser aplicadas para detecção de sequências endógenas pelo fato de não fornecer uma diferenciação quanto sequências epissomais ou integradas. PCR-Imunocaptura foi a primeira técnica descrita como sendo capaz de realizar distinção entre sequências epissomais das EPRVs de BSV (HARPER et al., 1999), porém para inhame a utilização desta técnica não forneceu resultados confiáveis (SEAL et al., 2014). Uma abordagem alternativa utilizando RCA (*Rolling circle amplification*) como método de diferenciação de sequências epissomais das sequências integradas de BSV em cultivares de banana (*Musa* spp.), sendo possível inclusive detectar de maneira diferencial sequências integradas de *Sugarcane bacilliform virus* em cana de açúcar e *Cauliflower mosaic virus* em nabo (JAMES et al., 2010), mostrou-se bastante eficiente. Como acontece para BSV, esta técnica pode ser utilizada para detecção de formas epissomais de badnavirus no inhame.

Os resultados obtidos neste trabalho, demonstram a presença de DBALV e DBSNV nos bancos de germoplasma avaliados. A presença de DBALV pode ser explicada pelo fato de que os acessos de *D. alata* e *D. cayenensis* disponíveis nos BGs foram, em grande parte, oriundos da região Nordeste, para a qual altos níveis de incidência de DBALV são

encontrados. No entanto, não se pode descartar a hipótese de que DBALV chegou aos BGs por meio de transmissão pelo inseto vetor, visto que os acessos são mantidos em condições de campo sem proteção contra esses insetos.

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 o 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 fim de possibilitar o uso de medidas de controle efetivas visando evitar sua futura dispersão para áreas livres dessa espécie.

Apesar de Bousalem et al., (2009) relatarem a detecção de um evento de recombinação entre dois isolados avaliados em seu estudo (DeBV-B e DeBV-A) ambos sendo obtidos de *D. alata*, as análises realizadas com as amostras não detectou nenhum evento de recombinação. A não detecção de possíveis eventos de recombinação pode estar relacionada com a pequena região genômica analisada para esse estudo.

4. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste estudo indicam que o DBALV encontra-se amplamente disseminado no território brasileiro. Adicionalmente, a detecção de DBSNV refuta a hipótese de que DBALV é a única espécie de badnavírus infectando inhame no Brasil. No entanto, estudos adicionais são necessários para determinar com precisão a incidência e distribuição de DBSNV nas áreas de cultivo de inhame do país.

Os resultados indicam também a possível presença de sequências endógenas no genoma das amostras de inhame utilizadas neste estudo. Contudo, a presença destas sequências endógenas necessita de maiores confirmações.

A presença de vírus em acessos de bancos de germoplasmas sinaliza para a necessidade de uma maior preocupação acerca do manejo adequado, a fim de se garantir plantas livres de vírus, permitindo assim um intercâmbio seguro, e em longo prazo a distribuição de material sadio para o agricultor.

5. REFERÊNCIAS

- AHLAWAT, Y. S. et al. Association of a badnavirus with citrus mosaic disease in India. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 80, p. 590-592, 1996.
- AIGHEWI, B. A.; ASIEDU, R.; AKORODA, M. O. Seed yam production from presprouted minisetts with varied thicknesses of storage parenchyma. **African Journal of Root and Tuber Crops**, v. 5, n. 2, p. 21–24, 2003.
- ALEMAN-VERDAGUER, M. E. G. U. C.; DUBERN, J.; BEACHY, R. N.; FAUQUET, C. Analysis of the sequence diversity of the P1, HC, P3, NIb and CP genomic regions of several yam mosaic potyvirus isolates: implications for the intraspecies molecular diversity of potyviruses. **Journal of General Virology**, v.78, p. 1253-1264, 1997.
- ALTSCHUL, S.F. et al. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, U.S.A, v. 215, p. 403 - 410, 1990.
- AMUSA, N. A.; ADEGBITA, A. A.; MUHAMMED, S.; DAIYEWU, R. Yam diseases and its management in Nigeria. **African. Journal of Biotechnology**, v. 2, p. 497-502, 2003.
- 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.
- ARBOLEDA, M.; AZZAM, O. Inter- and intra-site genetic diversity of natural field populations of *Rice Tungro Bacilliform Virus* in the Philippines. **Archives of Virology**, v. 145, n. 2, p 275-89, 2000.
- ASALA, S. et al. Distribution and incidence of viruses infecting yam (*Dioscorea spp.*) in Nigeria. **G.J.B.B**, vol 1(2), 163-167, 2012.
- ASIEDU, R.; SARTIE, A. Crops that feed the World 1. Yams: Yams for income and food security. **Food Security**, v. 2, p. 305-315, 2010.
- BESPALHOK, J. C. F.; GUERRA, E. P.; OLIVEIRA, R. Uso e conservação do germoplasma. In: BESPALHOK, J. C. F.; GUERRA, E. P.; OLIVEIRA, R. **Melhoramento de Plantas**. Disponível em: [http:// www.bespa.agrarias.ufpr.br/conteudo](http://www.bespa.agrarias.ufpr.br/conteudo) (2007). Acesso em: 28 de jun. 2014.
- BOUHIDA, M. L.; LOCKHART, B. E.; OLSZEWSKI, N. E. An analysis of the complete sequence of a sugarcane bacilliform virus genome infectious to banana and rice. **Journal of General Virology**, v. 74, p.15-22, 1993.
- BOUSALEM, M. et al. Dilemmas caused by endogenous pararetroviruses regarding the taxonomy and diagnosis of yam (*Dioscorea spp.*) badnaviruses: analyses to support safe germplasm movement. **Archives of Virology**, v. 154, p.297–314, 2009.
- BRIDDON, R. W. et al. Analysis of the sequence of *Dioscorea Alata* bacilliform virus: comparison to others members of the badnavirus group. **Virus Genes**, v. 18, p. 277-283, 1999.

BRUNT A. A. et al. **Plant Viruses Online**: Descriptions and Lists from the VIDE Database, 1996. Disponível em: <<http://biology.anu.edu.au/Groups/MES/vide/>> Acesso em: 16 set. 2013.

CHABANNES, M. et al. Three infectious viral species lying in wait in the banana genome. **Journal of Virology**, v. 87, 8624–8637, 2013.

CHABANNES, M.; ISKRA-CARUANA, M. L. Endogenous pararetroviruses a reservoir of virus infection in plants. **Current Opinion in Virology**. (2013). Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.coviro.2013.08.012>, pii:S1879-6257(13)00148-X.

CHENG, Y. H.; YANG, J. S.; YEH, S. D. Efficient transformation of papaya by coat protein gene of papaya ringspot virus mediated by agrobacterium following liquid-phase wounding of embryogenic tissues with caborundum. **Plant Cell Reports**, v. 16, p. 127-132, 1996.

CHILE. Ministério da Agricultura. Conservacion acceso y valorizacion del patrimonio filogenético: acciones y mejoras de los bancos de germoplasma em Chile. Santiago, Fevereiro, 2014. Disponível em: <http://www.minagri.gob.cl/wpcontent/uploads/2014/03/Acciones-y-Mejoras-de-los-Bancos-de-Germoplasma-en-Chile-1.pdf>. Acesso em 27 jun. 2014.

COELHO, R. S. B. Resistência genética a doenças na cultura do inhame (*Dioscorea* spp.). In: II SIMPÓSIO NACIONAL SOBRE AS CULTURAS DO INHAME E DO TARO. **Anais** João Pessoa: EMEPA-PB, 2002.

COOK, A. A. Diseases of tropical and sub tropical vegetables and other plants. **New York: Hafner Press**, 1978. 381p.

COURSEY, D. G. **Descriptors of Yam** (*Dioscorea* sp.). Rome: IBPGR Secretariat, 1980.

DAHAL G. O. et al. Relationship between natural occurrence of banana streak badnavirus and symptom expression, relative concentration of viral antigen, and yield characteristics of some micropropagated *Musa* spp. **Plant Pathology**, v. 49, p. 68-79, 2000.

DALLOT, S. A. P. et al. Evidence that the proliferation stage of micropropagation procedure is determinant in the expression of Banana streak virus integrated in the genome of FHIA 21 hybrid (*Musa* AAAB). **Archives of Virology**, v. 146, p. 2179-2190, 2001.

DAVINO, S. et al. Two new natural begomovirus recombinants associated with the tomato yellow leaf curl disease co-exist with parental viruses in tomato epidemics in Italy. **Virus Research**, v. 143, n.1, p.15-23, 2009.

DE KOCHKO, A. et al. *Cassava Vein Mosaic Virus* (CsVMV), type species for a new genus of plant double stranded DNA viruses? **Archives of Virology**, v. 143, p.945-962, 1998.

DELANOY, M. et al. Development of realtime PCR for the rapid detection of episomal Banana streak virus (BSV). **Plant Disease**, v.87, p.33-8, 2003.

DOYLE, J. J.; DOYLE, J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, v.1, p.13-15, 1991.

DRAKE, J. W. A constant rate of spontaneous mutations in DNA- based microbes. **Proceedings of the National Academy of Sciences** v. 88, p. 7160 – 7164, 1991.

DRAKE, J. W. Rates of spontaneous mutations among RNA viruses. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 90, p. 4171 – 4175, 1993.

DRAKE, J. W.; HOLLAND, J. J. Mutation rates among RNA viruses. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 96, n. 24, p. 13910-3, 1999.

DUFFY S.; HOLMES E.C. Validation of high rates of nucleotide substitution in geminiviruses: phylogenetic evidence from East African cassava mosaic viruses. **Journal of General Virology**, v. 90, p. 1539–1547, 2009.

DUFFY, S.; SHACKELTON, L. A.; HOLMES, E. C. Rates of evolutionary change in viruses: patterns and determinants. **Nature Reviews Genetics**, v. 9, p. 267–276, 2008.

EDGAR R. C. MUSCLE: A multiple sequence alignment method with reduced time and space complexity. **Bmc Bioinformatics**, v. 5, p. 1-19, 2004.

EMATER/IPA. **Sistemas de produção para cará da costa: Agreste Setentrional, Agreste Meridional e Mata Norte**. Recife: Empresa de Assistência Técnica e Extensão Rural do Estado de Pernambuco/Empresa Pernambucana de Pesquisa Agropecuária, 1985.

ENI, A. O. et al. Incidence and diversity of mixed viruses lower in yam tubers and tuber sprouts compared with field leaf samples: Implications for virus-free planting material control strategy. **African Journal of Agricultural Research**, Vol. 8(23), pp. 3060-3067, 2013.

ENI, A. O. et al. Sequence diversity among *Badnavirus* isolates infecting yam (*Dioscorea spp.*) in Ghana, Togo, Benin and Nigeria. **Archives of Virology**, v.153, p. 2263-2272, 2008.

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**, 6(5): 4158-4163, 2010.

FAO. (2012). **FAO** – Food and Agriculture Organization. Faostat. Disponível em: <<http://faostat3.fao.org>>. Acesso em: 09 de jan. 2014.

FAO. (2013). Tratado Internacional para los Recursos Fitogenéticos para la Alimentación y la Agricultura. Acesso em 20 de Junho de 2014. Disponível em: <http://www.planttreaty.org/es>

FAUQUET, C. et al. **Virus taxonomy**. Eight Report of the International committee on Taxonomy of Viruses. Amsterdam. Elsevier. 2005.

FROISSART, R. et al. Recombination every day: abundant recombination in a virus during a single multi-cellular host infection. **PLOS Biol**, v. 3, n. 3, p. 89, 2005.

GARCÍA-ANDRÉS, S. et al. Begomovirus genetic diversity in the native plant reservoir *Solanum nigrum*: Evidence for the presence of a new virus species of recombinant nature. **Virology**, v. 350, n. 2, p. 433-42, 2006.

GARCIA-ARENAL, F.; FRAILE, A. E.; MALPICA, J.M. Variability and genetic structure of plant virus populations. **Annual Review of Phytopathology**, v.39, p 157-186. 2001.

GARCIA-ARENAL, F.; FRAILE, A. E.; MALPICA, J.M. Variation and evolution of plant virus populations. **International Microbiology**, v. 6, p 225-232. 2003.

GARCIA-DIAZ, M.; BEBENEK, K. Multiple functions of DNA polymerases. **CRC Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 2, p. 105-122, 2007.

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

GAYRAL, P.; ISKRA-CARUANA, M. Phylogeny of Banana Streak Virus Reveals Recent and Repetitive Endogenization in the Genome of Its Banana Host (*Musa* sp.). **Journal of Molecular Evolution**, v. 69, p. 65-80, 2009.

GEERING, A. D. W. et al. Genetic diversity among Banana streak virus isolates from Australia. **Phytopathology**, v. 90, p. 921-927, 2000.

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.

GEERING, A. D.; SCHARASCHKIN, T.; TEYCHENEY, P. Y. The classification and nomenclature of endogenous viruses of the family Caulimoviridae. **Archives of Virology**, v. 155, n. 1, p. 123-31, 2010.

GIBBS M.J; WEILLER G.F. Evidence that a plant virus switched hosts to infect a vertebrate and then recombined with a vertebrate-infecting virus. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 96, n. 14, p. 8022-8027, 1999.

GOUDOU-URBINO, C. K. et al. A etiology and ecology of a yam mosaic disease in Burkina Faso. **Tropical Sciences**, v. 36, p.34-40, 1996.

GUIMARÃES, K. M. C. **Estrutura genética de uma população do badnavirus *Dioscorea bacilliform alata virus* (DBALV) que infecta inhame (*Dioscorea* spp.) no Nordeste do Brasil**. Dissertação (Mestrado em Proteção de Plantas) – Universidade Federal de Alagoas, 2013.

HAGEN, L. S. et al. Nucleotide sequence and genomic organisation of cacao swollen shoot virus. **Virology**, v. 196, p.619-628, 1993.

HARPER, G. et al. Viral sequences integrated into plant genomes. **Annual Review of Phytopathology**, v. 40, p.119-136, 2002.

HARPER, G.; HULL, R. Cloning and sequence analysis of Banana Streak Virus DNA. **Virus Genes**, v. 17, p. 271-278, 1998.

HOLLAND, J. J. et al. Rapid evolution of RNA genomes. **Science**. v. 215, p. 1577- 1585, 1982.

HUGHES, J. D. A.; DONGO, L.; ATIRI, G. I. Viruses infecting cultivated yams (*Dioscorea alata* and *D. rotundata*) in Nigeria. **Phytopathology**, v. 87, p.45, 1997.

HULL, R.; HARPER, G.; LOCKHART, B. Viral sequences integrated into plant genomes. **Trends in Plant Science**, v.5, 362–365, 2000.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **SIDRA 2008**: Sistema IBGE de recuperação automática. Rio de Janeiro: Unidade Estadual – AL. Supervisão Estadual de Pesquisas Agropecuárias. Disponível em: < <http://www.sidra.ibge.gov.br>>. Acesso em: 06 dez. 2013.

IITA Annual Report (2010). International Institute of Tropical Agriculture (IITA).(2001). **Yam improvement program at IITA, Ibadan, Nigeria pp 36.**International Institute of Tropical Agriculture IITA, (1995). Yam research at IITA., 1971-1993. Crop improvement Division.Root and tuber improvement program. IITA, Ibadan, Nigeria.Pp 38.

ISKRA-CARUANA, M. L.; CHABANNES, M.; DUROY, P.O.; MULLER, E. A possible scenario for the evolution of Banana streak virus in banana. **Virus Research**, 2014.

ISKRA-CARUANA, M.L. et al. A four-partnerplant–virus interaction: enemies can also come from within. **Molecular Plant Microbe Interactions**, v.23, 1394–1402, 2010.

JAMES, A. et al. Development of a novel rolling-circle amplification technique to detect Banana streak virus which also discriminates between integrated and episomal virus sequences. **Plant Disease**, 95, pp. 57-62, 2010.

JENKINS, G. M. et al. Rates of molecular evolution in RNA viruses: a quantitative phylogenetics analysis. **Journal of Molecular Evolution**, v. 54, p. 152–161, 2002.

KENYON, L. et al. An overview of viruses infecting *Dioscorea* yams in Sub-Saharan Africa. In: J.d’A. Hughes, and B.O. Odu. **Plant Virology in Sub- Saharan Africa**, 2001. p. 432-439.

KENYON, L. et al. Yams (*Dioscorea* spp.) from the South Pacific Islands contain many novel badnaviruses: implications for international movement of yam germplasm, **Archives of Virology**, v. 3, p.877–889, 2008.

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.

LACO, G. S.; BEACHY, R. N. Rice tungro bacilliform virus encodes reverse transcriptase, DNA polymerase and ribonuclease H activities. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 91, p. 2654-2658, 1994.

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

LEBOT, V. Tropical root and tuber crops Cassava, sweet potato, yams and aroids. **Publ. CABI**. 413p, 2009.

- LEFEUVRE, P. et al. *Begomovirus* 'melting pot' in the south-west Indian Ocean islands: molecular diversity and evolution through recombination. **Journal of General Virology**. v. 12, p. 3458-68, 2007.
- LIMA, J.S. et al. Variabilidade genética de isolados de badnavírus infectando inhame (*Dioscorea* spp.) no Nordeste do Brasil. **Tropical Plant Pathology**, v.38, p.349-353, 2013.
- LOCKART, B. E. L. et al. Identification of Piper yellow mottle virus, a mealybug transmitted badnavirus infecting *Piper* spp. **Southeast Asia. European of Plant Pathology**, v. 103, p.303-311, 1997.
- LOCKHART, B. E. L.; AUTREY, L. J. C. Occurrence in sugarcane of a bacilliform virus related serologically to banana streak virus. **Plant Disease** v. 72, p.230-233, 1988.
- LOCKHART, B. E. L.; OLSZEWSKI, N.E. Serological and genomic heterogeneity of banana streak badnavirus: implications for virus detection in *Musa* germplasm, Breeding Banana and Plantain for Resistance to Diseases and Pests. **CIRAD/INIBAP**, p. 105-113, 1993.
- MAFRA, R. C. **Recomendações técnicas para o cultivo do cará**. Brasília: Centro Nacional de Pesquisa de Hortaliças – EMBRAPA, 1986.
- 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.
- MARTÍN, A. **Los marcadores genéticos en la Mejora Vegetal**. En: Genómica y Mejora Vegetal. NUEZ, F.; CARRILLO, J. M.; LOZANO, R. (Eds). Mundi-Prensa. Sevilla. pp. 37-64, 2002.
- MARTIN, D.; RYBICKI, E. RDP: detection of recombination amongst aligned sequences. **Bioinformatics**, 16, 562-563, 2000.
- MCDONALD, B. A.; ZHAN, J.; BURDON, J. J. Genetic structure of *Rhynchosporium secalis* in Australia. **Phytopathology**, v. 89, p. 639-45, 1999.
- MEDBERRY, S. L.; LOCKHART, B. E. L.; OLSZEWSKI, N. E. Properties of Commelina yellow mottle virus complete DNA sequence, genomic discontinuities and transcript suggest that it is a pararetrovirus. **Nucleic Acids Research**, v. 18, p.5505-5513, 1990.
- MESQUITA, A. S. Inhame-*Dioscorea cayennensis* Lam. e taro *Colocassia esculenta* (L) Schott - Cenários dos mercados brasileiros e internacional. In: II SIMPÓSIO NACIONAL SOBRE AS CULTURAS DO INHAME E TARO. **Anais** João Pessoa: EMEPA-PB, 2002, p.215-238.
- MIEGE, J. Influence de quelques caractères des tubercules semences sur la levée et le rendement des ignames cultivées. **Journal d'Agriculture Tropicale et de Botanique Appliquée**, v. 4, p. 315-341, 1957.
- MIGLIORI, A.; LASTRA, R. Etude de vi rus present chez *Commelina diffusa* Burm. en Guadeloupe. **Annals of Phytopathology**, v. 10, p.467-477, 1978.

- MILGROOM, M. G. Analysis of population structure in fungal plant pathogens. In: Leslie, J. F. e Frederiksen, R. A. (Eds.) **Disease analysis through genetics and biotechnology**. Iowa State University, Ames. p. 213-229, 1995.
- MONCI, F. al. A natural recombinant between the geminiviruses Tomato yellow leaf curl Sardinia virus and Tomato yellow leaf curl virus exhibits a novel pathogenic phenotype and is becoming prevalent in Spanish populations. **Virology**. v. 303, n. 2, p. 317-26, 2002.
- MORILLA, G. et al. Tête à tête of tomato yellow leaf curl virus and tomato yellow leaf curl sardinia virus in single nuclei. **Journal of Virology**, Washington, v. 78, p. 10715-10723, 2004.
- MOURA, R. M. “Podridão aquosa” uma nova doença do inhame (*Dioscorea cayennensis* Lam.) causada pelo fungo *Rhizopus oryzae*. **Fitopatologia Brasileira** v. 12, p. 369-373, 1987.
- MOURA, R. M. **Doenças do Inhame** (*Dioscorea cayennensis* Lam. var. *rotundata* Poir). In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A.; REZENDE, J. A. M. (Eds.). **Manual de Fitopatologia**. São Paulo: Ceres, 1997. v.2, Doenças das Plantas Cultivadas. 3ª Ed.
- MOURA, R. M. **Doenças do Inhame-da-Costa**. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A.; REZENDE, J. A. M. (Eds.). **Manual de Fitopatologia**. São Paulo: Ceres, 2005. v.2, Doenças das Plantas Cultivadas. 4ª Ed. cap. 47, p.415-419.
- MOURA, R. M. Principais doenças do inhame-da-costa no Nordeste do Brasil. **Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agrônômica**, vol. 3, p.180-199, 2006.
- MOURA, R. M. Problemas fitossanitários do inhame no Nordeste e proposta para um sistema integrado de controle. In: II SIMPÓSIO NACIONAL SOBRE AS CULTURAS DO INHAME E TARO. **Anais**: João Pessoa: EMEPA-PB, 2002.
- MOURA, R. M.; RIBEIRO, G. P.; COELHO R. B. C.; SILVA JÚNIOR, J. N. *Penicillium sclerotigenum* Yamamoto, principal fungo causador de podridão em túberas de inhame (*Dioscorea caynnensis* Lam.) no Estado de Pernambuco (Brasil). **Fitopatologia Brasileira**, v. 1, p. 67-78, 1976.
- MUHIRE B. et al. A genome-wide pairwise-identity-based proposal for the classification of viruses in the genus Mastrevirus (family Geminiviridae). **Archives of virology**, 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23340592>>. Acesso em: jun. 2014.
- MUNFORD, R. A.; SEAL, S. E. Rapid single-tube immunocapture RT-PCR for the detection of two yam potyviruses. **Journal of Virological Methods**, v. 69, p. 73–79, 1997.
- NDOWORA, T. D. G. et al. Evidence that badnavirus infection in Musa can originate from integrated pararetroviral sequences. **Virology**, v. 255, p.214-220, 1999.
- NOREEN, F. et al. Distinct expression of Petunia vein clearing virus and the DNA transposon dTph1 in two Petuniahybrida lines is correlated with differences in histone modification and siRNAproduction. **Plant Journal**, v.50, 219–229, 2007.
- ODU B. O. et al. Isolation, characterisation and identification of a potyvirus from *Dioscorea alata* (water yam) in Nigeria. **Annals of Applied Biology**, v.139: 65-71, 1999.

ODU, B. O. et al. Responses of white yam (*Dioscorea rotundata*) cultivars to inoculation with three viruses. **Plant Pathology**, v. 53, p. 141–147, 2004.

ODU, B.O. et al. Reaction of White Guinea yam (*Dioscorea rotundata* Poir.) genotypes to virus diseases in four agroecological zones in Nigeria. **Journal of Phytopathology**, v. 154, p. 688-693, 2006.

OFFIE, S. K. Virus and viral diseases of sub-Saharan Africa: analysis of responses to questionnaires by scientists in sub-Saharan Africa. **Plant Virology in Sub-Saharan Africa**, p.128-136, 2001.

OLIVEIRA, I. S. et al. Patogenicidade de *Penicillium sclerotigenum* a diferentes frutas e hortaliças em pós-colheita. **Fitopatologia Brasileira**, v. 31, n. 4, p. 408-410, 2006.

OMURA, T. et al. Improved purification procedure and RNA segments of rice ragged stunt virus. **Annals of the Phytopathological Society of Japan**, v. 49, p. 670-675, 1983.

PADIDAM, M.; BEACHY, R.N.; FAUQUET, C.M. A phage single-stranded DNA (ssDNA) binding protein complements ssDNA accumulation of a geminivirus and interferes with viral movement. **Journal of Virology**, v. 73, p. 1609-1616, 1999.

PEDRALLI, G. Dioscoreaceae e Araceae: Aspectos taxonômicos, Etnobotânicos e Espécies nativas com Potencial para Melhoramento Genético. In: II SIMPÓSIO NACIONAL SOBRE AS CULTURAS DO INHAME E TARO, 1. 2002. João Pessoa. **Anais...** João Pessoa: EMEPA-PB, 2002.

PEDRALLI, G. Revisão taxonômica das espécies de Dioscoreácea (R.Br.) Lindley da Cadeia do Espinhaço, Minas Gerais e Bahia. (Tese Doutorado). São Paulo: Depto. Botânica/USP, 1997.

PEIXOTO, P. A. S. et al. **Inhame: o nordeste fértil**. Maceió: EDUFAL, INCAPER. 2000.

PHILLIPS, S. et al. The Partial Characterization of a Badnavirus Infecting the Greater Asiatic or Water Yam (*Dioscorea alata*). **Journal of Phytopathology**, v. 147, p. 265-269, 1999.

PIO-RIBEIRO, G. et al. Detecção de potyvírus em inhame em áreas produtoras de Pernambuco e obtenção de matrizes in vitro. **Fitopatologia Brasileira**, v.30, p. 183, 2005.

PITA, J. S. et al. Recombination, pseudorecombination and synergism of geminiviruses are determinant keys to the epidemic of severe cassava mosaic disease in Uganda. **Journal of General Virology**, London, v. 82, p. 655-665, 2001.

PURSEGLOVE, J. W. **Tropical crops monocotyledons**. 2 ed. London: Longman Group Limited, 1975.

RANEY, J. L.; DELONGCHAMP, R. R.; VALENTINE, C. R. Spontaneous mutant frequency and mutation spectrum for gene A of phiX174 grown in *E. coli*. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 44, p. 119–127, 2004.

RIBEIRO, S. G. et al. Distribution and genetic diversity of tomato-infecting begomoviruses in Brazil. **Archives of Virology**, v. 148, p. 281-295, 2003.

RIDLEY, M. **Evolução**. 3ª Ed. São Paulo. Artmed, 2006.

RITZINGER, C. H. S. P. et al. Aspectos fitossanitários da cultura do inhame. 2003, 39p. (Documentos EMBRAPA/SPI).

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

RONZELLI JÚNIOR, P. Capítulo III: Introdução e adaptação de plantas. **Melhoramento genético de plantas**. Curitiba, P. Ronzelli Jr., 1996. 25-40.

SANT'ANA, M. M. **Ocorrência do *Banana streak virus* (BSV) e do *Cucumber mosaic virus* (CMV) em cultivo convencional e orgânico de bananeiras (*Musa spp.*) no vale do ribeira**. 2013. 77 p. Dissertação (Mestrado em Sanidade Animal, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio) – Instituto Biológico (São Paulo).

SANTOS, E. S. Esclarecimentos sobre as denominações dos gêneros *Dioscorea* e *Colocasia*. In: II SIMPÓSIO NACIONAL SOBRE AS CULTURAS DO INHAME E TARO, **Anais...** João Pessoa: EMEPA-PB, 2002.

SANTOS, E. S. et al. Inhame (*Dioscorea* sp.): Tecnologias de produção e preservação ambiental. **Tecnol. & Ciên. Agropec.**, João Pessoa, v. 1, n. 1, p. 31-36, 2007.

SANTOS, E. S.; MACÊDO L. Tendências e perspectivas da cultura do inhame (*Dioscorea* sp.) no Nordeste do Brasil. In: II SIMPÓSIO NACIONAL SOBRE AS CULTURAS DO INHAME E TARO. **Anais...** João Pessoa: EMEPA-PB, 2002.

SANTOS, E.S. Inhame (*Dioscorea* spp.): aspectos básicos da cultura. João Pessoa: **EMEPA-PB**, SEBRAE, 1996. 158 p.

SANZ, A. I. et al. Multiple infection, recombination and genome relationships among begomovirus isolates found in cotton and other plants in Pakistan. **Journal of General Virology**, v. 81, p. 1839-1849, 2000.

SEAL, S. et al. The prevalence of badnaviruses in West Africa yams (*Dioscorea cayenensis-rotundata*) and evidence of endogenous pararetrovirus sequences in their genomes. **Virus Research**. (2014). Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.virusres.2014.01.007>.

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

SHACKELTON, L. A. et al. JC virus evolution and its association with human populations. **Journal of Virology**, v. 80, p. 9928–9933, 2006.

SILVEIRA, D. G. et al. Indexação biológica de genótipos de bananeira para o Banana streak vírus. **Summa Phytopathol.** Botucatu, v. 34, n. 2, p. 172-174, 2008.

SIQUEIRA, M. V. B. M. Inhame (*Dioscorea* spp): uma cultura ainda negligenciada. **Horticultura Brasileira**, v. 27, n. 2, p. 4075-4090, 2009.

SQUIRES, J.; GILLESPIE, T.; SCHOELZ, J.E; PALUKAITIS, P. Excision and episomal replication of cauliflower mosaic virus integrated into a plant genome. **Plant Physiology**, v. 155, p. 1908-1919, 2011.

STAGINNUS, C. et al. Suggestions for a nomenclature of endogenous pararetroviral sequences in plants. **Archives of Virology** 154, 1189–1193, 2009.

STAGINNUS, C.; RICHERT-PÖGGELER, K.R. Endogenous pararetroviruses: two faced travelers in the plant genome. **Trends in Plant Sciences**, v. 11, p. 485-491, 2006.

TAMURA, K. et al. MEGA 5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. **Molecular Biology and Evolution**, v.28, p.2731–2739, 2011.

TEMIN, H. M. Reverse transcription in the eukaryotic genome: Retroviruses, pararetroviruses, retrotransposons, and retrotranscripts. **Molecular Biology and Evolution**, v. 2, p.455-468, 1985.

TERRY, E. R. **Incidence, symptomatology, and transmission of a yam virus in Nigeria.** In: PROCEEDINGS OF THE 4TH SYMPOSIUM OF THE INTERNATIONAL SOCIETY FOR TROPICAL ROOT CROPS, 1976. Cali, Ed. J. COCK, R. MCINTYRE e M. GRAHAM, 1976. p. 170-173.

THOUVENEL, J. C.; DUMONT, R. An epidemiological approach to the study of yam mosaic viruses in the Ivory Coast. **Proc. Int. Soc. Tropical Root Crops**, v. 45, p. 643- 649, 1988.

THOUVENEL, J. C.; FAUQUET, C. Yam mosaic, a potyvirus infecting *Dioscorea cayenensis* in the Ivory Coast. **Annals of Applied Biology**, v. 93, n. 4, 1979.

TORRES-PACHECO, I. et al. Detection and distribution of geminiviruses in Mexico and the Southern United States. **Phytopathology**, v. 86, p. 1186-1192, 1996.

TOUALY, M. N. Y. et al. Distribution, incidence and severity of viral diseases of yam (*Dioscorea* spp.) in Côte d'Ivoire. **African Journal of Biotechnology**, v. 13(3), pp. 465-470, 2014.

UMBER, M. et al. The genome of African yam (*Dioscorea cayenensis*-rotundata complex) hosts endogenous sequences from four distinct badnavirus species. **Molecular Plant Pathology**, mpp.12137, 2014.

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

ZHOU, X. et al. Evidence that DNA-A of a geminivirus associated with severe cassava mosaic disease in Uganda has arisen by interspecific recombination. **Journal of General Virology**, v. 78, p. 2101-2111, 1997.