



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE FITOPATOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOPATOLOGIA**

VIROMA DE BATATA-DOCE NO BRASIL E LIMPEZA CLONAL DE CULTIVARES RICAS EM BETA-CAROTENO

CAROLINE DO AMARAL SOUZA

**Brasília – DF
2018**

CAROLINE DO AMARAL SOUZA

**VIROMA DE BATATA-DOCE NO BRASIL E LIMPEZA CLONAL DE
CULTIVARES RICAS EM BETA-CAROTENO**

Tese apresentada à Universidade de Brasília como requisito parcial para a obtenção do título de Doutora em Fitopatologia pelo Programa de Pós Graduação em Fitopatologia.

ORIENTADORA:

Prof^ª Dr^ª. Rita de Cássia Pereira Carvalho

**BRASÍLIA
DISTRITO FEDERAL - Brasil
2018**

FICHA CATALOGRÁFICA

Ao meu noivo Armando Junior que foi meu porto seguro durante esta caminhada

DEDICO

AGRADECIMENTOS

- A Deus pelo dom da vida;
- À Universidade de Brasília
- Ao Departamento de Fitopatologia da Universidade de Brasília e a todos os professores que contribuíram para minha formação profissional.
- À Capes e ao CNPq, pela concessão da bolsa de estudos durante o curso.
- À professora Rita de Cássia Pereira-Carvalho, pela orientação, paciência e amizade.
- Aos familiares que me apoiaram e incentivaram em todos os momentos da minha vida.
- À equipe do Laboratório de Virologia: Fernanda, Macária, Luciane e Felipe pela amizade sincera e momentos de descontração.
- Aos alunos de graduação: Mariana, Brenda, Ângela e Matheus pela contribuição e troca de experiências.
- Às amigas Flávia Milene e Josiane Goulart, pelo companheirismo, auxílio e carinho.
- Aos funcionários da Estação Experimental de Biologia da UnB, Sr. Fábio Fonseca, Evandro Calixto e Sr. Francisco pela amizade e presteza.
- A Dra. Maria Esther de N. Fonseca (Embrapa Hortaliças) e ao Analista José Getúlio da Silva Filho (Embrapa Hortaliças) pelo apoio nas análises de carotenoides via HPLC.
- A todos que de alguma forma contribuíram para conclusão deste trabalho

Trabalho realizado junto ao Programa de Pós-graduação em Fitopatologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, sob orientação da Prof^a. Rita de Cássia Pereira Carvalho, com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES; Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq

VIROMA DE BATATA-DOCE NO BRASIL E LIMPEZA CLONAL DE CULTIVARES RICAS EM BETA-CAROTENO

CAROLINE DO AMARAL SOUZA

TESE APROVADA em 15/02/2018 por:

Prof^o. Dr^o. Leonardo Silva Boiteux
(Examinador Interno ao Programa – UnB)

Dr^a. Mirtes Freitas Lima
(Examinador Externo ao Programa – Embrapa Hortaliças)

Dr^a. Genira Pereira de Andrade
(Examinador Externo ao Programa – UFRPE)

Prof^o. Dr^o. Renato de Oliveira Resende
(Examinador Interno ao Programa – UnB)
Suplente

Prof^a. Dr^a. Rita de Cássia Pereira-Carvalho – Orientadora
(Presidente da Banca – UnB)

**BRASÍLIA – DISTRITO FEDERAL
BRASIL
2018**

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	x
LISTA DE FIGURAS	xii
RESUMO GERAL	1
GENERAL ABSTRACT	3
INTRODUÇÃO GERAL	5
OBJETIVO GERAL	9
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	9
CAPÍTULO 1: Revisão de Literatura	10
REVISÃO DE LITERATURA	11
1. A cultura da batata-doce.....	11
1.1. Doenças de etiologia viral e principais vetores	14
1.1.1 Espécies do gênero <i>Begomovirus</i>	18
1.1.2 Espécies do gênero <i>Mastrevirus</i>	19
1.1.3 Espécies do gênero <i>Potyvirus</i>	20
1.2 Detecção de vírus em batata-doce.....	21
1.3 <i>Next Generation Sequencing</i> – NGS.....	22
2. Manejo de vírus de batata-doce por meio de técnicas de cultura de tecidos e termoterapia.....	27
3. LITERATURA CITADA.....	32
CAPÍTULO 2: Viroma e efeito de filtro de enxertia de <i>Ipomoea batatas</i> em <i>Ipomoea setosa</i> em relação à translocação de espécies de vírus.	42
RESUMO	43
ABSTRACT	44
1. INTRODUÇÃO.....	45
2. MATERIAL E MÉTODOS	48
2.1 Origem das amostras utilizadas.....	48
2.2 Manutenção das plantas utilizadas	51
2.3 Detecção viral utilizando métodos sorológicos.....	51
2.3.1 Detecção de <i>Sweet potato mild mottle virus</i> (SPMMV) e <i>Sweet potato feathery mottle virus</i> (SPFMV) por <i>Dot-Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i> – Dot-ELISA	51
2.4 Detecção viral por meio de análise metagenômica	52
2.4.1 Enxertia de <i>Ipomoea batatas</i> em <i>Ipomoea setosa</i>	52
2.4.2 Semipurificação de partículas virais – Enriquecimento para vírus de RNA.....	53
2.4.3 Extração de ácidos nucleicos (em <i>pool</i> para <i>Next Generation Sequencing</i>).....	54
2.4.4 Sequenciamento de alto desempenho – Triagem, montagem e análise dos <i>contigs</i>	56

2.4.5 Extração de RNA total de amostras individuais de <i>Ipomoea batatas</i> e <i>Ipomoea setosa</i>	56
2.4.6 Extração de DNA total de amostras individuais de <i>Ipomoea batatas</i> e <i>Ipomoea setosa</i>	57
2.4.7 Amplificação por círculo rolante (<i>Rolling Circle Amplification - RCA</i>) – Enriquecimento para vírus de DNA circular.....	58
2.4.8 Desenho de <i>primers</i> para detecção de espécies virais.....	59
2.4.9 RT-PCR (<i>Reverse Transcriptase - Polymerase Chain Reaction</i>).....	63
2.4.10 Purificação.....	64
2.4.11 Clonagem de Sweet potato symptomless mastrevirus 1 – SPSMV-1.....	64
2.4.12 Análise filogenética.....	67
3. RESULTADOS.....	67
3.1 Detecção viral utilizando-se métodos sorológicos.....	67
3.1.1 Detecção de <i>Sweet potato mild mottle virus</i> (SPMMV) e <i>Sweet potato feathery mottle virus</i> (SPFMV) por <i>Dot-Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i> – Dot-ELISA....	67
3.2 Detecção viral por meio de análise metagenômica.....	70
3.2.1 Sequenciamento de alto desempenho - Triagem, montagem e análise dos <i>contigs</i>	70
3.2.2 Análise filogenética utilizando sequências de nucleotídeos da poliproteína dos isolados de potyvírus SPFMV, SPVG e SPVC.....	75
3.2.3 Análise filogenética utilizando sequências de nucleotídeos do genoma completo dos isolados de begomovírus SPLCV, SPMV e SPGVaV.....	75
3.2.4 Análise filogenética utilizando sequências de nucleotídeos do genoma completo de mastrevírus SPSMV-1.....	75
4. DISCUSSÃO.....	79
5. CONCLUSÕES.....	82
6. LITERATURA CITADA.....	83
CAPÍTULO 3: Seleção por <i>High Performance Liquid Chromatography</i> – HPLC de genótipos de batata-doce com alto teor de beta-caroteno e produção de materiais livres de vírus.....	87
RESUMO.....	88
ABSTRACT.....	89
1. INTRODUÇÃO.....	90
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	94
2.1 Origem e manutenção das plantas de batata-doce.....	94
2.2 Produção das raízes de batata-doce para análise por <i>High Performance Liquid Chromatography</i> – HPLC.....	94
2.3 Origem das amostras para análise por <i>High Performance Liquid Chromatography</i> – HPLC e cultura de tecidos.....	95
2.4 Extração e análise de carotenóides de batata-doce por <i>High Performance Liquid Chromatography</i> – HPLC.....	98
2.5 Cultura de tecidos e recuperação de plantas de batata-doce livres de vírus.....	102

2.6 Indexação das plantas regeneradas.....	103
3. RESULTADOS	107
3.1 Análise de beta-caroteno	107
4. DISCUSSÃO.....	119
5. CONCLUSÕES.....	122
6. PERSPECTIVAS	122
7. LITERATURA CITADA.....	122
CONCLUSÕES GERAIS	127
ANEXOS	129
Anexo 1 Sequências do genoma completo de espécies do gênero <i>Potyvirus</i> e seus respectivos números de acesso no GenBank utilizadas na construção da árvore filogenética do genoma completo.....	130
Anexo 2. Sequências do gênero <i>Begomovirus</i> e seus respectivos números de acesso no GenBank utilizadas na construção da árvore filogenética do genoma completo	131
Anexo 3. Sequências do genoma completo de espécies do gênero <i>Mastrevirus</i> e seus respectivos números de acesso no GenBank utilizadas na construção da árvore filogenética do genoma completo	133
Anexo 4. Genome Announcements.....	134
Anexo 5. Plant Disease Note.....	135

LISTA DE TABELAS

Página

CAPÍTULO 1: Revisão de Literatura

Tabela 1. Espécies de vírus pertencentes a diferentes gêneros e famílias descritas na cultura da batata-doce (<i>Ipomoea batatas</i>) no mundo.....	15
Tabela 2. Estirpes da espécie <i>Sweet potato leaf curl virus</i> descritas infectando a cultura da batata-doce (<i>Ipomoea batatas</i>).....	16
Tabela 3. Detecção de espécies de vírus em batata-doce (<i>Ipomoea batatas</i>) no Brasil e as diferentes técnicas empregadas para diagnose.....	17
Tabela 4. Lista de cultivares de batata-doce (<i>Ipomoea batatas</i>) registradas no Ministério de Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA).....	30

CAPÍTULO 2: Viroma e efeito de filtro de enxertia de *Ipomoea batatas* em *Ipomoea setosa* quanto a translocação de espécies de vírus

Tabela 1. Lista de variedades de batata-doce (<i>Ipomoea batatas</i>) utilizadas no presente trabalho e respectivos locais de coleta.....	48
Tabela 2. Cultivares de batata-doce (<i>Ipomoea batatas</i>) selecionadas para realização de testes de detecção viral e os respectivos locais de coleta	60
Tabela 3. <i>Primers</i> desenhados com base nas sequências obtidas pelo sequenciamento <i>Illumina</i> para detecção das espécies de vírus identificadas por <i>Next Generation Sequencing</i> - NGS em batata-doce (<i>Ipomoea batatas</i>).....	61
Tabela 4. <i>Primers</i> obtidos da literatura para detecção das espécies de vírus obtidas por <i>Next Generation Sequencing</i> - NGS neste trabalho em cultivares de batata-doce (<i>Ipomoea batatas</i>).....	62
Tabela 5. Plantas de diferentes cultivares de batata-doce (<i>Ipomoea batatas</i>) avaliadas quanto à presença das espécies virais <i>Sweet potato mild mottle virus</i> -SPMMV e <i>Sweet potato feathery mottle virus</i> -SPFMV por <i>Dot-Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i> (Dot-ELISA).....	68
Tabela 6. Número total de <i>reads</i> para cada biblioteca produzida pelo sequenciamento <i>Illumina HiSeq</i> e <i>contigs</i> de sequências virais recuperadas.....	71
Tabela 7. Relação das espécies de vírus e os respectivos gêneros, identificados em cada biblioteca produzida no sequenciamento <i>Illumina HiSeq</i>	73
Tabela 8. Resultado da avaliação de amostras de batata-doce (<i>Ipomoea batatas</i>) quanto a presença de espécies virais por PCR e RT-PCR.....	74

CAPÍTULO 3: Seleção por *High Performance Liquid Chromatography* – HPLC de genótipos de batata-doce com alto teor de beta-caroteno e produção de materiais livres de vírus

Tabela 1. Cultivares de batata-doce (<i>Ipomoea batatas</i>) utilizadas neste trabalho.....	96
Tabela 2. <i>Primers</i> desenhados com base nas sequências obtidas no sequenciamento <i>Illumina</i> de amostras de batata-doce (<i>Ipomoea batatas</i>) para detecção de três espécies de <i>Potyvirus</i> e uma de <i>Crinivirus</i>	105
Tabela 3. <i>Primers</i> utilizados para detecção de espécies virais dos gêneros <i>Ipomovirus</i> , <i>Begomovirus</i> , <i>Cavemovirus</i> e <i>Mastrevirus</i>	106
Tabela 4. Avaliação de cultivares de batata-doce (<i>Ipomoea batatas</i>) utilizadas para colorimetria e quantificação de carotenoides totais e beta-caroteno por meio de cromatografia por HPLC.....	108
Tabela 5. Amostras de batata-doce (<i>Ipomoea batatas</i>) avaliadas quanto à presença de espécies de vírus por PCR e RT-PCR, antes de proceder-se a limpeza clonal.....	117
Tabela 6. Avaliação de amostras de batata-doce (<i>Ipomoea batatas</i>) regeneradas e avaliadas quanto a presença de espécies de vírus.....	118

LISTA DE FIGURAS

Página

CAPÍTULO 1: Revisão de Literatura

Figura 1. Esquema das etapas do sequenciamento utilizando a plataforma *Illumina*. **A** - Genoma alvo; **B** - Material genético fragmentado (*reads*); **C** - Ligação dos adaptadores nas sequências de DNA; **D** - Ligação dos fragmentos ao suporte sólido; **E** - Formação de pontes, amplificação e formação dos *clusters*; **F** - Emissão de um sinal de luz para cada nucleotídeo adicionado e **G** - Leitura da sequência de nucleotídeos. Fonte: Mardis (2008); Carvalho & Silva (2010) com adaptações..... 24

CAPÍTULO 2: Viroma e efeito de filtro de enxertia de *Ipomoea batatas* em *Ipomoea setosa* quanto a translocação de espécies de vírus

Figura 1. Folhas de plantas de batata-doce (*Ipomoea batatas*) exibindo sintomas típicos de infecção por vírus. **A** - Folha da cv. Princesa - Paudalho / Pernambuco (PE) com clorose internerval; **B** - Folha da cv. Acesso 1219 - IPA (Instituto Agrônomo de Pernambuco) / PE, com clorose nas nervuras; **C** - Folha da cv. Ligeirinha - Pedra de Fogo / Paraíba, apresentando sintomas de bronzeamento e **D** - Plantas de batata-doce enxertadas em *Ipomoea setosa* (Fotos: Caroline Souza)..... 53

Figura 2. Esquema da preparação das amostras para sequenciamento. **A** - Folha de *Ipomoea setosa* com sintoma de clareamento das nervuras, **B** - Maceração de folhas em nitrogênio líquido, **C** - Folhas maceradas com tampão fosfato de sódio, **D** - Centrifuga preparativa - *Thermo Scientific*, **E** - Tubo de ultracentrifuga com a amostra e colchão de sacarose no fundo, **F** - Ultracentrifuga Beckman Coulter, **G** - Homogeneização do pélete e **H** - Tubo RNASTable - Biomátrica. (Fotos: Michele Pantoja e Caroline Souza)..... 54

Figura 3. Pontos de coleta das amostras de batata-doce (*Ipomoea batatas*) por Estado 59

Figura 4. Mapa do vetor pGEM- T Easy utilizado para clonagem da espécie viral Sweet potato symptomless mastrevirus 1 - SPSMV-1 (*Mastrevirus*)..... 67

Figura 5. Árvore filogenética gerada por *Neighbor-Joining* com *bootstrap* de 1.000 repetições utilizando a sequência nucleotídica da poliproteína das espécies de *Potyvirus* *Sweet potato feathery mottle virus*-SPFMV, *Sweet potato virus G*-SPVG e *Sweet potato virus C*-SPVC, recuperadas neste trabalho, com sequências dos genomas completos de outros *Potyvirus* (*Sweet potato latente virus*-SPLV, *Sweet potato virus 2*-SPV2) que infectam a batata-doce (*Ipomoea batatas*) depositadas no GenBank. Os genomas recuperados neste trabalho estão destacados em azul. A espécie *Potato virus Y*-PVY, um membro do gênero *Potyvirus*, foi usado como *outgroup*..... 76

Figura 6. Árvore filogenética gerada por *Neighbor-Joining* com *bootstrap* de 1.000 repetições utilizando a sequência nucleotídica do genoma completo das espécies de *Begomovirus* *Sweet potato leaf curl virus*-SPLCV, *Sweet potato mosaic virus*-SPMV e *Sweet potato golden vein associated virus*-SPGVaV, recuperadas neste trabalho, com sequências dos genomas completos de outros isolados de *Begomovirus* depositados no GenBank. Os genomas recuperados neste trabalho estão destacados em azul. A espécie

Tomato chlorotic mottle virus-ToCMoV, um membro do gênero *Begomovirus*, foi usado como *outgroup*..... 77

Figura 7. Árvore filogenética gerada por *Neighbor-Joining* com *bootstrap* de 1.000 repetições utilizando a sequência nucleotídica do genoma completo da espécie de *Mastrevirus* Sweet potato symptomless vírus 1-SPSMV-1, recuperada neste trabalho, com sequências dos genomas completos de outras espécies de *Mastrevirus* depositadas no GenBank. O genoma recuperado neste trabalho está destacado em azul. A espécie *Tomato leaf curl virus-TLCV*, um membro do gênero *Begomovirus*, foi usado como *outgroup*..... 78

CAPÍTULO 3: Seleção por *High Performance Liquid Chromatography* – HPLC de genótipos de batata-doce com alto teor de beta-caroteno e produção de materiais livres de vírus

Figura 1. Cultivo de batata-doce (*Ipomoea batatas*) no campo de Estação Experimental de Biologia da Universidade de Brasília (Foto: Caroline Souza)..... 95

Figura 2. Raízes tuberosas de batata-doce (*Ipomoea batatas*). **A** - Cultivar Amélia e **B** - Cultivar Beauregard, ambas provenientes do Banco Ativo de Germoplasma da Fazenda Água Limpa (BAG/FAL) da Universidade de Brasília (UnB); **C** - Cultivar CR-06 e **D** - Cultivar Pérola. **C** e **D** - ambas provenientes do Banco Ativo de Germoplasma de Universidade Federal Rural de Pernambuco (BAG/UFRPE). 100

Figura 3. Sequência de atividades preparativas para análise por *High Performance Liquid Chromatography* – HPLC em amostras de batata-doce (*Ipomoea batatas*). **A** - Plantio de ramos de batata-doce em campo da Estação Experimental de Biologia da Universidade de Brasília; **B** - Seleção, limpeza e pesagem das raízes colhidas; **C** - Tecido da raiz triturado e homogeneizado; **D** - Extração dos carotenóides em acetona; **E** - Solução dos pigmentos em éter de petróleo transferida para um balão volumétrico; **F** - Filtragem das amostras para leitura; **G** - Amostras organizadas em suporte para leitura de carotenóides em cromatógrafo e **H** - Cromatógrafo (LC-20A Prominence). Fotos (Caroline Souza)..... 101

Figura 4. Esquema do processo de limpeza clonal e regeneração das plantas de batata-doce (*Ipomoea batatas*). **A** a **D** - Amostras de batata-doce selecionadas por HPLC: (**A**) Amélia, (**B**) Beauregard, (**C**) CR-07 e (**D**) Pérola, **E** - Ápices caulinares das plantas selecionadas, **F** - Esterilização dos ápices em hipoclorito de sódio, **G** - Retirada dos meristemas em lupa, **H** - Meristemas no meio de cultura M&S líquido para crescimento, **I** - Plântulas regeneradas após 60 dias em meio líquido, **J** - Transferência das plântulas para meio M&S sólido, **K** - Tubos de ensaio com meio sólido para desenvolvimento das plântulas, **L** - Amostra regenerada (Pérola) após 30 dias em substrato, **M** - Amostras de batata-doce regeneradas: plantas mantidas em caixas isoladas para aclimação: **N** – Amélia e **O** - Pérola e **P** - CR-06. 103

Figura 5. Cromatograma *High Performance Liquid Chromatography* - HPLC de carotenóides em extrato de batata-doce (*Ipomoea batatas*). **A** - Planta de batata-doce cv. Amélia proveniente do Banco Ativo de Germoplasma da Fazenda Água Limpa

(BAG/FAL) da Universidade de Brasília (UnB); **B** - Raiz da batata-doce cv. Amélia após 120 de cultivo e **C** - Gráfico dos picos de carotenóides da cv. Amélia. 113

Figura 6. Cromatograma de *High Performance Liquid Chromatography* - HPLC de carotenóides em extrato de batata-doce (*Ipomoea batatas*). **A** - Planta de batata-doce cv. Beauregard proveniente do Banco Ativo de Germoplasma da Fazenda Água Limpa (BAG/FAL) da Universidade de Brasília (UnB); **B** - Raiz da batata-doce cv. Beauregard e **C** - Gráfico dos picos de carotenóides da cv. Beauregard. 114

Figura 7. Cromatograma *High Performance Liquid Chromatography* - HPLC de carotenóides em extrato de batata-doce (*Ipomoea batatas*). **A** - Planta de batata-doce cv. CR-O6 proveniente do Banco Ativo de Germoplasma de Universidade Federal Rural de Pernambuco (BAG/UFRPE); **B** - Raiz da batata-doce cv. CR-O6 e **C** - Gráfico dos picos de carotenóides da cv. CR-O6. 115

Figura 8. Cromatograma *High Performance Liquid Chromatography* - HPLC de carotenóides em extrato de batata-doce (*Ipomoea batatas*). **A** - Planta de batata-doce cv. Pérola proveniente do Banco Ativo de Germoplasma de Universidade Federal Rural de Pernambuco (BAG/UFRPE); **B** - Raiz da batata-doce cv Pérola e **C** - Gráfico dos picos de carotenóides da cv. Pérola. 116

RESUMO GERAL

SOUZA, Caroline do Amaral. **Viroma de batata-doce no Brasil e limpeza clonal de cultivares ricas em beta-caroteno**. 2018. (136 p.) Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Universidade de Brasília, Brasília, DF.

No Brasil, o cultivo da batata-doce [*Ipomoea batatas* L. (Lam.)], abrange todas as regiões geográficas, sendo os maiores Estados produtores o Rio Grande do Sul, São Paulo, Sergipe, Minas Gerais e Santa Catarina. Diversas características da batata-doce, tais como: rusticidade, facilidade cultivo, baixo custo de produção e seu o papel como fonte de energia e nutrientes tornam esta espécie de elevada importância, sobretudo para a população de baixa renda. A batata-doce pode ser afetada por espécies dos quatro principais grupos de patógenos, sendo que os vírus merecem destaque devido ao número de espécies, os danos causados e a propagação vegetativa desta planta. A detecção de vírus em batata-doce tem sido realizada, tradicionalmente, por meio das técnicas de *Polymerase Chain Reaction* (PCR), *Reverse Transcription PCR* (RT-PCR) e *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA). Contudo, uma nova abordagem de detecção viral vem sendo empregada batata-doce desde 2009. Trata-se da metagenômica: uma abordagem baseada na investigação das moléculas de ácidos nucleicos de uma mistura de populações microbianas, extraídas diretamente de amostras ambientais e sequenciadas por *Next Generation Sequencing* (NGS). Uma vez que se tenha conhecimento das espécies virais que infectam a cultura é possível a aplicação de medidas adequadas de controle, incluindo programas de limpeza clonal (para regeneração de plantas livres de vírus). Com isso, visto a importância dos problemas fitossanitários causados por espécies virais na cultura batata-doce, os objetivos deste trabalho foram: **(a)** selecionar variedades de batata-doce ricas em beta-caroteno, **(b)** identificar os vírus presentes em batata-doce, procedentes de cinco regiões do Brasil e **(c)** produzir material livre de vírus por meio de cultivo de meristemas. Para realização deste trabalho um total de 100 cultivares/clones da batata-doce foi obtido de Regiões Produtoras

de Pernambuco (RPP), Rio Grande do Norte e Paraíba, além de acessos mantidos no Banco Ativo de Germoplasma da Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE (BAG-UFRPE), do Instituto Agrônômico de Pernambuco (IPA) e do BAG da Fazenda Água Limpa da Universidade de Brasília (FAL/UnB). Cem amostras de batata-doce foram enxertadas em plantas de *Ipomoea setosa*. Após 60 dias, realizou-se um enriquecimento de partículas virais dos 100 cultivares/clones de plantas de batata-doce, potencialmente transmitidos para *I. setosa* via enxertia. O mesmo procedimento foi realizado, diretamente, a partir das folhas de batata-doce, com o objetivo de comparar as espécies virais presentes nas diferentes plantas. Para tal estudo, quatro bibliotecas foram geradas sendo RNA e DNA de batata-doce e RNA e DNA de *I. setosa*. Um sequenciamento por NGS (em *pool*) foi conduzido, sendo possível detectar sequências de nove espécies virais que infectando a batata-doce: *Sweet potato chlorotic stunt virus* – SPCSV RNA1 e 2, *Sweet potato feathery mottle virus* – SPFMV, *Sweet potato virus C* – SPVC, *Sweet potato virus G* – SPVG e *Sweet potato C-6 virus* – SPC6V, *Sweet potato leaf curl virus* – SPLCV, *Sweet potato mosaic virus* – SPMV, *Sweet potato golden vein associated virus* – SPGVaV e *Sweet potato symptomless virus 1* – SPSMV-1, sendo que este último ainda não havia sido detectado no Brasil. Os 100 cultivares/clones foram cultivados em campo com o objetivo de identificar usando *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC), genótipos de batata-doce ricos em beta-caroteno. Quatro cultivares (‘Amélia’, ‘Beauregard’, ‘CR06’ e ‘Pérola’) apresentaram teores de beta-caroteno elevados. Estas plantas foram regeneradas por cultivo de meristemas e indexadas quanto à presença das espécies virais acima citadas, sendo possível regenerar pelo menos uma planta da cultivar ‘Amélia’ livre de vírus. Estes materiais serão usados futuramente em ensaios visando complementar os postulados de Koch para SPSMV-1.

Palavras chave: cultura de tecidos, NGS, *Ipomoea batatas*

Orientadora – Prof^ª Dr^ª Rita de Cássia Pereira Carvalho – Universidade de Brasília

GENERAL ABSTRACT

Souza, Caroline do Amaral. **Virome of sweet potato in Brazil and clonal cleaning of cultivars rich in beta-carotene**. 2018. (136 p.) Doctoral Thesis in Plant Pathology. Universidade de Brasília, DF.

In Brazil, the sweet potato [*Ipomoea batatas* L. (. Lam)] crop covers all geographic regions of the country. The States of Rio Grande do Sul, São Paulo, Sergipe, Minas Gerais, and Santa Catarina are the largest producers. Sweet potato is a very important crop due to several positive features such as rusticity, low production cost (due to low demand for agricultural inputs) as well functioning as source of food energy and nutrient supply especially for the low-income populations. Sweet potatoes can be affected by many pathogens, in special viruses. In fact, a high number of viral species have been reported infecting this crop. The problems associated with virus infection are intensified in sweet potato due to its vegetative propagation system. The virus detection in sweet potato has been carried out by Polymerase Chain Reaction (PCR), Reverse Transcription PCR (RT-PCR), and Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). However, metagenomic, a new viral detection methodology has been also used for virus detection in sweet potatoes since 2009. This approach is based upon investigating the nucleic acid molecules from a mixture of microbial populations extracted directly from environmental samples and sequenced by Next Generation Sequencing (NGS). The knowledge about the viral species infecting sweet-potato in Brazil may allow the adoption of the appropriate control measures, including, the establishment of clonal cleaning programs via regeneration of plants free of viruses. In this context, the objectives of the present work are: **(a)** to select varieties of sweet potato rich in beta-carotene; **(b)** to assess the virus diversity in sweet potatoes in samples from five production regions of Brazil, and **(c)** to produce virus-free materials via meristem culture. For this work a total of 100 sweet potato accessions were obtained from Producing Regions of Pernambuco (RPP), Rio Grande do Norte, and Paraíba. In addition, a subset of clones from the germplasm bank of the Rural Federal University of Pernambuco – UFRPE, the

Agronomic Institute of Pernambuco and from germplasm bank of the “Fazenda Água Limpa” of the University of Brasilia were also employed in the present work. One hundred sweet-potato samples were grafted on *Ipomoea setosa*. After 60 days, a viral particles enrichment strategy was performed via grafting of all clones onto *I. setosa*. A virus enrichment procedure was also performed directly from the sweet-potato leaves in order to compare the viral species that could be found in the different plant species. For this study, four RNA and DNA libraries of sweet-potato and *I. setosa* were produced. Nine viral species were detected infecting the sweet-potato samples: *Sweet potato chlorotic stunt virus* – SPCSV RNA1 and 2, *Sweet potato feathery mottle virus* – SPFMV, *Sweet potato virus C* - SPVC, *Sweet potato virus G*-SPVG and *Sweet potato C-6 virus* – SPC6V, *Sweet potato leaf curl virus* - SPLCV, *Sweet potato mosaic virus* – SPMV, *Sweet potato golden vein virus* – SPGVaV, and *Sweet potato symptomless virus 1* – SPSMV1. This last virus species was detected in Brazil for the first time. A total of 100 sweet-potato accessions were grown under field conditions in order to identify (using High Performance Liquid Chromatography – HPLC) a subset of accessions with higher levels of beta-carotene. Three accessions with higher levels of beta-carotene (‘Amélia’, ‘Beauregard’, ‘CR06’, and ‘Pérola’) were regenerated via meristem culture and indexed for the presence of all nine virus species detected in previous assays. A single plant of cultivar ‘Amelia’ was identified as being free of all major viruses. These materials will be used in the future for fulfilling Koch’s postulates for SPSMV-1.

Keywords: *Ipomoea batatas*, next generation sequencing, tissue culture

Guidance Committee: Prof^ª Dr^ª Rita de Cássia Pereira Carvalho – University of Brasilia

INTRODUÇÃO GERAL

A batata-doce (*Ipomoea batatas* Lam.) (Schultz, 1968) é uma raiz tuberosa, pertencente à família Convolvulaceae (Filgueira, 2008), que é composta por 24 gêneros e 411 espécies, com distribuição em regiões tropicais e subtropicais (Barbosa *et al.*, 2012; Castro *et al.*, 2008). O Brasil detém o maior número de taxa, com cerca de 310 espécies, tendo distribuição geográfica ampla em diversos biomas brasileiros (Simão-Bianchini & Ferreira, 2015). De acordo com os dados do Centro Internacional de La Papa (CIP), a batata-doce ocupa o sétimo lugar em importância alimentar.

No Brasil, de acordo com o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE (2016), esta hortaliça tem maior importância sócioeconômica para as Regiões Sul e Nordeste com grande contribuição para produção nacional. Na Região Nordeste, a batata-doce apresenta grande importância social, por ser uma fonte de alimento energético e auxiliar na geração de emprego e renda no campo e na agroindústria (Santos *et al.*, 2009; Nunes *et al.*, 2012).

A batata-doce é hospedeira de diversos patógenos virais que induzem graves doenças que podem resultar em perdas significativas (Kwak *et al.*, 2015). Os danos causados pelos vírus se devem, principalmente, pelo fato desses patógenos atuarem em sinergismo, formando complexos virais e/ou infecções mistas. Estas infecções simultâneas por múltiplos patógenos virais podem desencadear doenças mais severas impondo danos consideráveis para a cultura (Untiveros *et al.*, 2007; Pio-Ribeiro *et al.*, 2016). Por ser uma planta predominantemente de propagação vegetativa, várias espécies de vírus podem se acumular nos propágulos da batata-doce, e esse acúmulo gera um processo conhecido como “degenerescência”, resultando em plantas de menor vigor e produtividade (Oliveira *et al.*, 2008, Fernandes & Dusi, 2013).

Atualmente, 34 espécies virais já foram relatadas infectando a cultura da batata-doce no mundo (Brown *et al.*, 2015; Gibson & Kreuze, 2015, Cao *et al.*, 2017), e destas 11 espécies foram relatadas no Brasil. Além do processo de “degenerescência”, a batata-doce também é

afetada por uma ampla gama de insetos, incluindo alguns que podem atuar como vetores de espécies virais. Como exemplo cita-se o aleirodídeo popularmente conhecido como mosca-branca (*Bemisia tabaci* Genn.). Esse aleirodídeo é altamente polífago e tem sido reportado como sendo capaz de transmitir espécies de quatro gêneros virais para essa cultura (Trenado *et al.*, 2011; Navas-Castillo *et al.* 2011; Polston *et al.*, 2014).

Para detecção de espécies virais em batata-doce têm sido utilizadas, em sua maioria, técnicas de diagnose como *Polymerase Chain Reaction* (PCR), *Reverse Transcription PCR* (RT-PCR) e *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) (Albuquerque *et al.*, 2012; Cuellar *et al.*, 2015; Sossah *et al.*, 2015), que requerem o conhecimento prévio do genoma viral ou, pelo menos, de um segmento desse genoma. Novas tecnologias para detecção viral vêm sendo incorporadas (desde o ano de 2002), aumentando, de maneira considerável, o conhecimento sobre a diversidade desses patógenos em diferentes ambientes e plantas hospedeiras (Mokili *et al.*, 2012). As principais tecnologias que estão sendo empregadas incluem o *Next Generation Sequencing* (NGS) que propicia um sequenciamento de ácidos nucleicos mais eficiente, mais rápido e de custo relativamente mais baixo em comparação com as tecnologias de sequenciamento tradicionais (Barba *et al.*, 2014). A tecnologia NGS permitiu desenvolver uma nova estratégia de detecção de patógenos: denominada de "metagenômica", cujo termo que foi usado pela primeira vez em 1998. A "metagenômica" tem como base o desenvolvimento de um método mais direto, global e rápido para acessar a diversidade genética da microflora do solo (Handelsman *et al.*, 1998).

Kreuze *et al.* (2009) foram os pioneiros na utilização de NGS para detecção de vírus em batata-doce, sequenciando siRNAs (small RNAs) por *Illumina Genome Analyzer* e obtiveram os *contigs* utilizando-se três *softwares* para montagem de genomas: SSAKE v3.2, VCAKE v1.0 e VELVET v0.6.04. Nesse trabalho, os autores propuseram que as sequências de potenciais novas espécies obtidas fossem classificadas nos gêneros *Badnavirus* e *Mastrevirus*. Kashif *et*

al. (2012) também realizaram a detecção de vírus em amostras de batata-doce coletadas em Honduras e Guatemala sequenciando siRNAs por *Illumina Genome Analyzer*. Como resultado deste trabalho foi possível detectar seis espécies virais após a montagem dos *contigs*.

O conhecimento das espécies de vírus que infectam a cultura permite a aplicação de medidas adequadas de controle que, para o caso da batata-doce, pode envolver tanto os programas de limpeza clonal (para regeneração de plantas livres de vírus) quanto dar suporte aos programas de identificação de cultivares potencialmente resistentes (Fernandes & Dusi, 2013).

Rós *et al.* (2011), indicam como uma importante estratégia de controle das viroses da batata-doce o plantio de estacas oriundas de material vegetativo livre de vírus. De fato, materiais obtidos de limpeza clonal apresentam maior produtividade quando comparados com aqueles originários de campos de produção (Loebenstein *et al.*, 2009; Clark *et al.*, 2012, Alam *et al.*, 2013). O material livre de vírus pode ser obtido pelo processo de cultura de ápices caulinares e tem possibilitado aumento substancial de rendimento (Loebenstein *et al.*, 2009; Clark *et al.*, 2012, Alam *et al.*, 2013).

A batata-doce apresenta um alto teor de carboidratos, fibras e sais minerais, que servem como fontes de nutrientes sobretudo para populações de baixa renda e sujeitas à restrição alimentar, especialmente em região vulneráveis tais como o Nordeste brasileiro. No Brasil, as variedades de batata-doce comercializadas são predominantemente de polpa branca, amarela e creme, contudo, as variedades de polpa alaranjada (mais ricas em carotenoides com ação de pró-vitamina A), não são amplamente cultivadas (Melo *et al.*, 2010).

Em 2011, a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa), juntamente com o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), lançou/validou quatro novas cultivares de batata-doce no Brasil: ‘Beauregard’, ‘BRS Amélia’, ‘BRS Rubissol’ e ‘BRS Cuia’, as quais apresentam qualidades nutricionais (maiores teores de beta-caroteno) e produtividade acima da média em relação às cultivares disponíveis no mercado (MAPA, 2014).

Neste contexto, a combinação de qualidade nutricional e de maiores níveis de produção pode beneficiar um grande número de pessoas com o fornecimento de batata-doce rica em beta-caroteno e isentas de vírus. Dessa forma, a detecção eficiente e o conhecimento sobre as espécies de vírus que infectam a batata-doce, bem como dos vetores que afetam a cultura, propiciam uma melhor aplicação de medidas de controle de viroses. Devido à importância econômica e social da batata-doce, é importante conduzir ações de pesquisa que visem minimizar os problemas causados por espécies virais que infectam esta hortaliça e que impactam negativamente os níveis de produção.

OBJETIVO GERAL

Os objetivos deste trabalho foram: **(1)** realizar um levantamento das espécies virais infectando a batata-doce no Brasil e avaliar o efeito de filtro de enxertias em *Ipomoea setosa*; **(2)** identificar e selecionar cultivares com teores mais elevados do carotenóide beta-caroteno; **(3)** produzir material livre de vírus por meio de cultura de tecidos.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Identificar (por meio de sequenciamento de alto desempenho - *Illumina/Hiseq*) as espécies virais ocorrendo naturalmente em plantas de batata-doce provenientes de cinco regiões do País e avaliar o efeito de filtro de enxertias em *Ipomoea setosa*.
- b) Analisar as sequências virais obtidas, bem como identificar vírus nas amostras individuais por meio da síntese de *primers* específicos.
- c) Recuperar o genoma completo de pelo menos uma espécie viral detectada via sequenciamento *Illumina/Hiseq*.
- d) Quantificar os teores de beta-caroteno de 100 cultivares/clones de batata-doce, por meio da utilização da técnica de *High-Performance Liquid Chromatography* (HPLC).
- e) Regenerar plantas de batata-doce sadias por meio do cultivo, *in vitro*, de meristemas apicais.

Capítulo 1

REVISÃO DE LITERATURA

REVISÃO DE LITERATURA

1. A cultura da batata-doce

A batata-doce [*Ipomoea batatas* L. (Lam.)] (Schultz, 1968) é uma hortaliça de raiz tuberosa classificada na família Convolvulaceae (Filgueira, 2008), que é composta por 24 gêneros e 411 espécies (Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2017).

Esta hortaliça é originária das Américas Central e do Sul, podendo ser encontrada desde a Península de Yucatam, no México, até a Colômbia (Silva *et al.*, 2008). No Brasil encontra-se o maior número de taxa no gênero *Ipomoea*, com 149 espécies dispersas em todos os biomas brasileiros, sendo mais frequentes em ambiente de campo aberto ou em bordas de mata (Simão-Bianchini & Ferreira, 2015). Dentre as espécies do gênero *Ipomoea*, a batata-doce apresenta maior destaque em termos de importância econômica, sendo muito utilizada na alimentação humana e animal (Simão-Bianchini & Ferreira, 2015).

De fato, a batata-doce é uma das culturas alimentares mais importantes do mundo em termos de consumo humano, sobretudo na África Subsaariana, em regiões da Ásia e em Ilhas do Pacífico (International Potato Center, 2015). A planta foi domesticada há mais de 5.000 anos na América Latina (Peixoto & Miranda, 1984), e atualmente é a raiz mais cultivada em países em desenvolvimento (International Potato Center, 2015). De acordo com os dados da FAO (2014), a batata-doce ocupa, em nível mundial, a sétima posição entre as culturas alimentares mais importantes. Nos países em desenvolvimento, contudo, esta cultura ocupa a quinta posição entre as mais importantes (International Potato Center, 2015). Na listagem das 50 *commodities* mundiais da FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations), a batata-doce ocupa a 16ª posição com uma produção mundial de mais de 103 milhões de toneladas por ano (Faostat, 2014). A China é o maior produtor (98,5 milhões de toneladas em 2013) e o consumidor mundial de batata-doce, seguida da Nigéria, Uganda, Indonésia e Vietnã (Faostat, 2014).

De acordo com os dados da Produção Agrícola Municipal do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística-PAM (IBGE, 2016), esta hortícola é cultivada em todas as regiões do País. No entanto, a Região Sul se destaca, sendo o Rio Grande do Sul o maior Estado produtor. Na última publicação dessa agência, a Região Nordeste está atualmente em terceiro lugar na produção nacional com 170.601 toneladas (t)/hectare (ha), ficando atrás das regiões Sul (249.154 t/ha) e Sudeste (222.180 t/ha). Apesar de ocupar o terceiro lugar em produção nacional, a Região Nordeste, apresenta maior importância em se tratando de consumo, devido a batata-doce ser muito apreciada pela população nordestina, além de apresentar características favoráveis aos pequenos produtores (principais responsáveis pela produção na região), como rusticidade e por ser uma fonte nutritiva para alimentação participando do suprimento de calorias, vitaminas e minerais na dieta alimentar humana e animal (Oliveira *et al.*, 2008; Oliveira *et al.*, 2013). No entanto, a produtividade dos plantios de batata-doce no Nordeste ainda é extremamente baixa ficando em torno de 8,6 t/ha (IBGE, 2016). Esse fato é reflexo da baixa adoção de tecnologias e carência de informações e conhecimentos adequados (principalmente com relação à fertilização orgânica e mineral) o que tem provocado perda de receita, falta de estímulo aos pequenos produtores e decréscimo da área plantada (Velho, 2016).

Os Estados que mais produzem batata-doce no Brasil são: Rio Grande do Sul (167.854 t); São Paulo (150.886 t), Minas Gerais (58.930 t); Paraná (48.957 t) e Sergipe (35.086 t), sendo responsáveis por aproximadamente 69% da produção nacional. Por sua vez, os Estados que se destacam com os maiores níveis de produtividade são: Mato Grosso (44.048 t/ha); Goiás (33.938 t/ha); Mato Grosso do Sul (24.773 t/ha); Espírito Santo (22.624 t/ha) e Paraná (21.768 t/ha) (IBGE, 2016).

Na Região Nordeste, a batata-doce tem grande importância social, por ser um alimento energético, e por sua produção e comercialização auxiliar na geração de emprego e renda a nível local (Santos *et al.*, 2009). Além disso, a batata-doce é, comparativamente, pouco exigente

em relação ao cultivo, apresentando baixo custo de produção. Esta espécie se desenvolve bem em diferentes tipos de clima e solo devido sua grande rusticidade (Pedrosa *et al.*, 2015). Por estes motivos, a produção de batata-doce tem sido conduzida, em grande parte, por pequenos produtores rurais, visando principalmente a produção familiar. No entanto, conforme mencionando anteriormente, os baixos níveis de adoção de tecnologia, a ocorrência de doenças e a falta de conhecimentos e suporte técnico aos produtores associados à baixa qualidade das mudas (relacionada principalmente à infecção por vírus) fazem com que a produtividade e qualidade da produção não alcancem níveis satisfatórios (Kroth *et al.*, 2001; International Potato Center, 2015).

A propagação da cultura (que é conduzida predominantemente de maneira vegetativa) favorece o acúmulo de patógenos, principalmente vírus, cujas espécies podem atuar em sinergismo através de infecções mistas e/ou formação de complexos virais. Estas infecções mistas podem induzir doenças ainda mais agressivas, resultando em danos consideráveis tanto na produtividade quanto na qualidade das raízes, culminando na degenerescência do cultivo (Untiveros *et al.*, 2007; Pio-Ribeiro *et al.*, 2016). Uma alternativa para diminuir o problema da degenerescência causada pelas doenças de etiologia viral é a utilização de plantas provenientes de material vegetativo livre de vírus, pois apresentam maior produtividade que as originárias de campos de produção e para isso, estratégias de cultura de tecido têm sido empregadas para obter estes materiais (Rós *et al.*, 2011). Um ponto agravante em termos de infecção virais é o fato da batata-doce também ser hospedeira da mosca-branca (*Bemisia tabaci*), que é um sério problema para a cultura em áreas tropicais e subtropicais (Tomar *et al.*, 2017). Esse inseto é altamente polífago tendo sido reportado como sendo capaz de transmitir, para essa cultura, 15 espécies pertencentes a quatro gêneros virais (Trenado *et al.*, 2011; Navas-Castillo *et al.*, 2011; Polston *et al.*, 2014).

1.1. Doenças de etiologia viral e principais vetores

Em relação às pragas, a cultura da batata-doce é, no geral, bem tolerante, apesar de poder ser acometida por diversos insetos que, quando em níveis populacionais elevados, podem provocar perdas na plantação. Pulgões e mosca-branca são exemplos de pragas potenciais devido ao fato de serem os principais transmissores de espécies virais nessa cultura (Valverde *et al.*, 2004). De acordo com Castro *et al.* (2013) as espécies *Brevicoryne brassicae* (L.) e *Myzus persicae* (Sulzer) (ambos Hemiptera: Aphididae), são pragas para batata-doce, com potencial de causar danos e transmitir vírus para essa cultura na região de Diamantina em Minas Gerais.

Quanto à mosca branca, do ponto de vista fitopatológico, a preocupação consiste na eficiente capacidade para transmitir uma ampla gama de vírus (Navas-Castillo *et al.*, 2011). A mosca branca transmite espécies virais pertencentes a cinco gêneros: *Begomovirus* (família *Geminiviridae*), *Carlavirus* (família *Betaflexiviridae*), *Crinivirus* (família *Closteroviridae*) *Ipomovirus* (família *Potyviridae*) e *Torradovirus* (família *Secoviridae*) (Navas-Castillo *et al.*, 2011; Polston *et al.*, 2014. Até o presente momento, destes cinco gêneros virais, apenas *Torradovirus* não foi reportado infectando batata-doce. Dentre os gêneros de vírus transmitidos por *B. tabaci* para batata-doce, os pertencentes ao gênero *Begomovirus* tem maior quantidade de espécies descritas (Zerbini *et al.*, 2017).

Atualmente existem 25 espécies virais aceitas pelo ICTV (International Committee of Taxonomy of Virus) e nove espécies tentativas que já foram relatadas infectando a cultura da batata-doce no Mundo (**Tabela 1**) (Brown *et al.*, 2015; Gibson & Kreuze, 2015). Uma destas 25 espécies virais é o *Sweet potato leaf curl virus* – SPLCV (gênero *Begomovirus*, família *Geminiviridae*), representada por 14 estirpes (**Tabela 2**) relatadas frequentemente na China, Espanha, Itália, Porto Rico, Estados Unidos e Brasil (Luan *et al.*, 2007; Lozano *et al.*, 2009; Albuquerque *et al.*, 2012), com 11 espécies de vírus relatadas no Brasil (**Tabela 3**).

Tabela 1. Espécies de vírus pertencentes a diferentes gêneros e famílias descritas na cultura da batata-doce (*Ipomoea batatas*) no mundo

Material genético	Família	Gênero	Espécies aceitas ¹	Espécies tentativas ²	Referências
DNA	<i>Geminiviridae</i>	<i>Begomovirus</i>	11	7	Brown <i>et al.</i> , 2015
		<i>Mastrevirus</i>	0	1	Kreuze <i>et al.</i> , 2009
	<i>Caulimoviridae</i>	<i>Solendovirus</i>	1	0	Cuellar <i>et al.</i> , 2011
		<i>Cavemovirus</i>	1	0	Clark <i>et al.</i> , 2012
		<i>Badnavirus</i>	1	0	Clark <i>et al.</i> , 2012
RNA	<i>Potyviridae</i>	<i>Potyvirus</i>	6	0	Alvarez <i>et al.</i> , 1997; Ateka <i>et al.</i> , 2004; Li <i>et al.</i> , 2012
		<i>Ipomovirus</i>	1	0	Liao <i>et al.</i> , 1979, Souza, 2013
	<i>Closteroviridae</i>	<i>Crinivirus</i>	1	0	Cuellar <i>et al.</i> , 2011
	<i>Betaflexiviridae</i>	<i>Carlavirus</i>	2	0	De Souza <i>et al.</i> , 2013
	<i>Luteoviridae</i>	Gênero Não Designado	1	0	Fuentes <i>et al.</i> , 1996
	<i>Secoviridae</i>	<i>Nepovirus</i>	0	1	Brown <i>et al.</i> , 1988
Total de espécies			25	9	

¹Espécies virais aceitas pelo International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV)

²Espécies virais submetidas ao International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV)

Tabela 2. Estirpes da espécie *Sweet potato leaf curl virus* descritas infectando a cultura da batata-doce (*Ipomoea batatas*)¹

Estirpes	Acrônimos
<i>Sweet potato leaf curl virus</i> - China [China-Yunnan-RL31-2006]	SPLCV-CN[CN-Yn-RL31-06]
<i>Sweet potato leaf curl virus</i> - [Spain-1998]	SPLCV-[ES-98]
<i>Sweet potato leaf curl virus</i> - Brazil [Brazil-Pará-Belém1-2008]	SPLCV-BR[BR-PA-Bel1-08]
<i>Sweet potato leaf curl virus</i> - Fujian [China-Jujian-Fp3-2007]	SPLCV-Fu[CN-Fuj-Ip3-07]
<i>Sweet potato leaf curl virus</i> - Italy [Italy-Sicily-2002]	SPLCV-IT[IT-Sic-02]
<i>Sweet potato leaf curl virus</i> - Japan [Japan-Miyazaki-1996]	SPLCV-JP[JR-Miy-96]
<i>Sweet potato leaf curl virus</i> - Paraíba [Brazil-Paraíba-Souza1-2008]	SPLCV-PB[BR-PB-Sou1-08]
<i>Sweet potato leaf curl virus</i> - Pernambuco [Brazil-Rondônia-Porto Velho-2008]	SPLCV-PE[BR-RO-PV-08]
<i>Sweet potato leaf curl virus</i> - Puerto Rico [Puerto Rico-80-N2-2006]	SPLCV-PR[PR-80-N2-06]
<i>Sweet potato leaf curl virus</i> - Rondônia [Brazil-Bahia-Utinga-2008]	SPLCV-RO[BR-BA-Uti-08]
<i>Sweet potato leaf curl virus</i> - São Paulo [Brazil-São Paulo-Alvares Machado-2009]	SPLCV-SP[BR-SP-AlvM-09]
<i>Sweet potato leaf curl virus</i> - South Carolina [United States-South Carolina-646-B11-2006]	SPLCV-SC[US-SC-646-B11-06]
<i>Sweet potato leaf curl virus</i> - Spain [Spain-Canary Islands-BG6-2002]	SPLCV-ES[ES-CI-BG6-02]
<i>Sweet potato leaf curl virus</i> - United States [United States- Louisiana-1994]	SPLCV-US[US-Lou-94]

¹Adaptado de Brown *et al.* (2015).

Tabela 3. Detecção de espécies de vírus em batata-doce (*Ipomoea batatas*) no Brasil e as diferentes técnicas empregadas para diagnose

Família	Gênero	Espécie	Técnica¹	Referência
<i>Betaflexiviridae</i>	<i>Carlavirus</i>	<i>Sweet potato chlorotic flecks virus</i> (SPCFV)	NCM- ELISA	Kroth <i>et al.</i> , 2001
<i>Bromoviridae</i>	<i>Cucumovirus</i>	<i>Cucumber mosaic virus</i> (CMV)		Fernandes <i>et al.</i> , 2012
<i>Caulimoviridae</i>	<i>Cavemovirus</i>	<i>Sweet potato collusive virus</i> (SPCV)		
<i>Closteroviridae</i>	<i>Crinivirus</i>	<i>Sweet potato chlorotic stunt virus</i> (SPCSV)	NCM- ELISA e Northern-blot	Pio-Ribeiro <i>et al.</i> , 1994
<i>Geminiviridae</i>	<i>Begomovirus</i>	<i>Sweet potato leaf curl virus</i> (SPLCV)	RCA e Sequenciamento	Paprotka <i>et al.</i> , 2010
		<i>Sweet potato leaf curl São Paulo virus</i>	PCR e Sequenciamento	Albuquerque <i>et al.</i> , 2011
<i>Potyviridae</i>	<i>Potyvirus</i>	<i>Sweet potato feathery mottle virus</i> (SPFMV)	NCM- ELISA	Pozzer <i>et al.</i> , 1992
		<i>Sweet potato latent virus</i> (SPLV)		Kroth <i>et al.</i> , 2001
		<i>Sweet potato mild speckling virus</i> (SPMSV)		
	<i>Sweet potato virus G</i> (SPVG)			
<i>Ipomovirus</i>	<i>Sweet potato mild mottle virus</i> (SPMMV)	NCM- ELISA	Fernandes <i>et al.</i> , 2012; Souza, 2013	

¹NCM- ELISA: Nitrocellulose Membrane-Enzyme Linked Immunosorbent Assay; PCR: Polymerase Chain Reaction; RCA: Rolling Circle Amplification

As famílias *Geminiviridae* e *Potyviridae* apresentam os maiores números de espécies reportadas infectando batata-doce (Wylie *et al.*, 2017; Zerbini *et al.*, 2017), sendo que espécies virais de ambas tendo sido relatadas em diversas áreas do Brasil e no mundo.

1.1.1 Espécies do gênero *Begomovirus*

O gênero *Begomovirus* encontra-se classificado na família *Geminiviridae*, apresentando como espécie tipo *Bean golden yellow mosaic virus* (BGYMV). Os critérios de demarcação de gênero na família são: gama de hospedeiras (monocotiledôneas ou dicotiledôneas), tipo de vetor (cigarrinhas, membracídeos, moscas brancas ou pulgões), organização do genoma (mono ou bipartido) e relações filogenéticas (Zerbini *et al.*, 2017). Este grupo de vírus pode apresentar genoma monopartido (um componente genômico, denominado DNA-A) ou bipartido (dois componentes denominados DNA-A e DNA-B), cada um de 2,5-2,6 kb, fita simples e genoma circular (Hanley-Bowdoin *et al.*, 2000). Os begomovírus com genoma monopartido, até o momento, foram predominantemente relatados no Velho Mundo (Europa, Ásia e África – Hemisfério Oriental), com poucas espécies de monopartidos registradas até o momento para o Novo Mundo. Dentre as quais podem ser citadas Tomato leaf deformation virus (ToLDeV) relatada recentemente infectando tomate no Peru e Equador (Melgarejo *et al.*, 2013); Tomato leaf curl purple vein virus (ToLCPVV) em plantas de tomate provenientes do nordeste do Brasil (Macedo *et al.*, 2017) e SPLCV que tem sido reportada infectando plantas de batata-doce em diversas regiões produtoras no Brasil e em outros países (Albuquerque *et al.*, 2011, Fuentes & Salazar, 2003). Por outro lado, as espécies com genoma bipartido foram predominantemente relatadas no chamado Novo Mundo (Américas- Hemisfério Ocidental) (Albuquerque *et al.*, 2011, Fuentes & Salazar, 2003).

Brown *et al.* (2015) realizaram uma revisão da taxonomia de *Begomovirus* e propuseram o valor de 91% de identidade de nucleotídeos, considerando-se o genoma completo ou apenas o

componente A, como o novo critério de demarcação de espécies dentro deste gênero. Quanto à demarcação de estirpes, até recentemente, eram aplicados os valores de 85 % a 96 % de identidade de sequência, para determinar estirpes e de 92 a 100 % para determinar variantes (Fauquet *et al.*, 2008). Brown *et al.* (2015), consideram o ponto de corte para a demarcação de estirpe em 94 % de identidade de nucleotídeos.

No Brasil o tomateiro e o feijoeiro são as culturas mais amplamente e severamente afetadas por espécies do gênero *Begomovirus* (Chaves *et al.*, 2017; Miyamoto *et al.*, 2017; Morales & Anderson, 2001), sendo sua transmissão principalmente realizada pela alimentação da mosca-branca numa relação circulativa não propagativa.

1.1.2 Espécies do gênero *Mastrevirus*

O gênero *Mastrevirus* se encontra classificado na família *Geminiviridae*, tem como espécie tipo *Maize streak virus* – MSV. O genoma dos *Mastrevirus* consiste em um único componente de DNA fita simples, circular, com 2.6 a 2.8 kb, não envelopado e monopartido (Zerbini *et al.*, 2017). Para a separação das espécies dentro do gênero, os critérios são: identidade de nucleotídeos acima de 78% em comparações de genomas completos, diferenças sorológicas da capa proteica, diferentes insetos vetores (Zerbini *et al.*, 2017).

Atualmente existem 32 espécies de *Mastrevirus* aceitas pelo ICTV. O mastrevírus que infecta a batata-doce, Sweet potato symptomless mastrevirus 1 (SPSMV-1), foi proposto como uma espécie tentativa (Kreuze *et al.*, 2009; Cao *et al.*, 2017). O SPSMV-1 foi detectado na Tanzânia, em alguns países da América Central, na China e Coreia (Kwak *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2015). Cao *et al.* (2017) reportaram o primeiro genoma completo para esta espécie viral. Eles detectaram SPSMV-1 em nove cultivares de batata-doce provenientes de cinco países: Coreia do Sul, Estados Unidos, Taiwan, China e Uruguai. No Brasil ainda não há relatos da presença desta espécie viral.

Espécies do gênero *Mastrevirus* infectam, em sua maioria, plantas monocotiledôneas, com exceção das espécies Tobacco yellow dwarf virus (TYDV) e Chickpea chlorotic dwarf virus (CpCDV) que são capazes de infectar plantas das famílias Solanaceae (TYDV), Fabaceae, Caricaceae e Cucurbitaceae (CpCDV) (Fiallo-Olivé *et al.*, 2017; Zaagueri *et al.*, 2017; Zerbini *et al.*, 2017). A transmissão destes vírus para as plantas ocorre via cigarrinhas (ordem Hemiptera, família Cicadellidae) numa relação circulativa não propagativa (Zerbini *et al.*, 2017).

1.1.3 Espécies do gênero *Potyvirus*

O gênero *Potyvirus* (família *Potyviridae*) apresenta partículas não envelopadas, alongadas e flexuosas com 680 a 900 nm de comprimento e 11 a 13 nm de diâmetro. Os *Potyvirus* são monopartidos com genoma de RNA fita simples, senso positivo com $\approx 11,6$ kb de tamanho (Wylie *et al.*, 2017). O critério de demarcação de gênero em *Potyviridae* é realizado por avaliação biológica, sobretudo pela transmissão por vetores específicos e dados moleculares (Adams *et al.*, 2005, Gibbs & Ohshima 2010, Wylie *et al.*, 2017). Dentro do gênero, as espécies podem ser separadas por identidade da ORF do genoma completo que deve ser maior que 76% de identidade de nucleotídeos e maior que 82% de identidade de aminoácidos ou em relação à capa proteica que é de 76-77% de identidade de nucleotídeos e 80% de identidade de aminoácidos (Wylie *et al.*, 2017).

Seis espécies de *Potyvirus*, que infectam a batata-doce, são atualmente aceitas pelo ICTV: *Sweet potato feathery mottle virus* (SPFMV), *Sweet potato latent virus* (SPLV), *Sweet potato mild speckling virus* (SPMSV), *Sweet potato virus 2* (SPV2), *Sweet potato virus C* (SPVC) e *Sweet potato virus G* (SPVG) (Wylie *et al.*, 2017). A espécie SPFMV tem sido relatada de forma endêmica na cultura da batata-doce tanto no Brasil quanto no mundo (Souza *et al.*, 2017; Mulabisana *et al.*, 2018; Maina *et al.*, 2018). Devido estarem amplamente distribuídos, os

potyvírus frequentemente formam complexos virais, induzindo graves sintomas nas plantas (Clark *et al.*, 2012). O SPFMV causa a doença conhecida como ‘mosqueado da batata-doce’, tendo registros recentes em São Paulo, Pernambuco, Paraíba, Distrito Federal, Rio de Janeiro e Rio Grande do Sul (Pio-Ribeiro *et al.*, 2016). As espécies deste gênero são transmitidas por picada de prova (relação inseto-vetor não persistente) de afídeos e, podem também, ser transmitidos mecanicamente (Wylie *et al.*, 2017).

1.2 Detecção de vírus em batata-doce

A partir do ano de 2002 vem ocorrendo na virologia vegetal a incorporação de novas tecnologias para detecção e levantamento de diversidade viral em diferentes ambientes e plantas hospedeiras (Mokili *et al.*, 2012). Kreuze *et al.* (2009), foram os pioneiros na utilização de novas metodologias para detecção de vírus em batata-doce quando foram capazes de identificar novas espécies dos gêneros *Badnavirus* e *Mastrevirus*, e conseguiram obter a sequência completa de um genoma viral via sequenciamento de alto rendimento (*Illumina/Solexa*) a partir de pequenos RNAs extraídos paralelamente de plantas sintomáticas e assintomáticas. Os resultados obtidos por Kreuze *et al.* (2009) permitiram a identificação de vírus de RNA, ssDNA (*single strand DNA*) e dsDNA (*double strand DNA*) e concluir que essa nova abordagem poderia não só identificar agentes virais conhecidos (que ocorrem a títulos extremamente baixos), mas também novos vírus, sem a necessidade de qualquer conhecimento prévio da sequência.

Kashif *et al.* (2012) realizaram a detecção de vírus em amostras de batata-doce coletadas em Honduras e Guatemala por sequenciamento de siRNAs (*small interfering RNAs*). Segundo os referidos autores, foi possível detectar *Sweet potato feathery mottle virus* estirpe RC – SPFMV-RC e *Sweet potato virus C* – SPVC (ambos no gênero *Potyvirus*); *Sweet potato chlorotic stunt virus* estirpe WA – SPCSV-WA (gênero *Crinivirus*), *Sweet potato leaf curl*

Georgia virus – SPLCGV (gênero *Begomovirus*) e *Sweet potato pakakuy virus* estirpe B – SPPV-B (sinônimo: Sweet potato badnavirus B – SPV-B). Desta forma, pode-se concluir que o sequenciamento de alto rendimento de siRNAs é adequado para utilização como método confiável para a detecção de vírus de plantas (Kashif *et al.*,2012).

1.3 Next Generation Sequencing – NGS

As novas tecnologias de sequenciamento começaram a ser utilizadas no início do século XXI, com uma plataforma de sequenciamento de DNA mais eficiente, rápida e de custo relativamente mais baixo em comparação com as tecnologias de sequenciamento de DNA tradicionais desenvolvidas no final de 1970 (Barba *et al.*, 2014). No final do século XX e início do século XXI, buscou-se desenvolver novos meios que substituíssem o método Sanger automatizado que é classificado como uma tecnologia de sequenciamento ‘de primeira geração’ (Barzon *et al.*, 2013). O sequenciamento Sanger é baseado na incorporação de deoxinucleotídeos (dNTPs) e de dideoxinucleotídeos (ddNTPs) a uma cadeia de DNA em crescimento, tendo como molde o DNA de interesse. Quando os ddNTPs são adicionados, a extensão da cadeia é interrompida pois esses dideoxinucleotídeos não apresentam um grupo hidroxila (OH) 3’ necessário para a ligação do próximo deoxinucleotídeo (dNTP). Como esses ddNTPs são marcados, podem ser detectados e a sequência dos nucleotídeos identificada (Sanger *et al.*, 1977b). O sequenciamento Sanger, também conhecido método da terminação de cadeia, gera várias cópias de cadeias de nucleotídeos com cerca de 300 a 750 pares de bases (pb) que diferem de tamanho por apenas uma base permitindo serem separadas e ordenadas (Sanger *et al.*, 1977a).

A utilização do método NGS tem mudado as abordagens científicas tanto em pesquisa básica como aplicada, especialmente em ramos do campo biológico, incluindo patologia e virologia vegetal (Barba *et al.*, 2014). Essas novas plataformas oferecem, de forma combinada,

vantagens como: velocidade, automatização e alto rendimento, aumentando assim a capacidade de sequenciamento de 100 para um milhão em relação à tecnologia de Sanger, ou seja, produzem milhões de *reads* (sequências curtas do genoma sequenciado), com cerca de 25 e 400 pb, dependendo da plataforma, com uma grande economia de tempo e com menor custo por base para o sequenciamento (Carvalho & Silva, 2010; Mokili *et al.*, 2012). A clonagem *in vitro*, responsável pela maior eficiência deste método, é realizada em suporte sólido onde milhares de leituras podem ser produzidas de uma só vez, gerando enormes quantidades de sequências que podem ser alinhadas com base em uma sequência/genoma de referência (Bentley, 2006; Carvalho & Silva, 2010). Cadeias de nucleotídeos maiores que 1000 bases, no entanto, não podem ser sequenciadas devido à limitação física da metodologia (Mardis, 2008). Dessa forma, deve-se primeiramente fragmentar a cadeia de nucleotídeos a ser estudada, sequenciar os fragmentos e depois montar/organizar os *reads* para obter a sequência original. As plataformas mais utilizadas são: Pirosequenciamento ou Roche 454, *Illumina* ou Solexa e SOLiD, chamadas de ‘sequenciamento de segunda geração’ (Carvalho & Silva, 2010).

A Solexa, que faz parte da empresa *Illumina*, desenvolveu uma tecnologia de sequenciamento similar ao sequenciamento Sanger, no que diz respeito à síntese usando DNA polimerase e nucleotídeos terminadores marcados com diferentes fluoróforos. No entanto, esta metodologia apresenta como inovação a clonagem *in vitro* dos fragmentos em uma plataforma sólida de vidro, onde este processo é conhecido como PCR de fase sólida (Mardis, 2008; Carvalho & Silva, 2010). No processo da PCR de fase sólida, as moléculas de DNA são inicialmente acopladas a *primers* e amplificadas formando agrupamentos de clonagem locais (Mardis, 2008). Quatro tipos de dideoxinucleotídeos com marcadores fluorescentes são adicionados, e os nucleotídeos não incorporados na sequência são removidos da solução. Diferente do pirosequenciamento, o DNA só é estendido um nucleotídeo por vez. Uma câmera fotografa os dideoxinucleotídeos marcados e, então, o marcador e o terminal que bloqueia a

continuação da síntese de DNA são removidos, permitindo um novo ciclo (Mardis, 2008). Esse tipo de sequenciamento gera milhões de sequências de 50-100 pb (**Figura 1**).

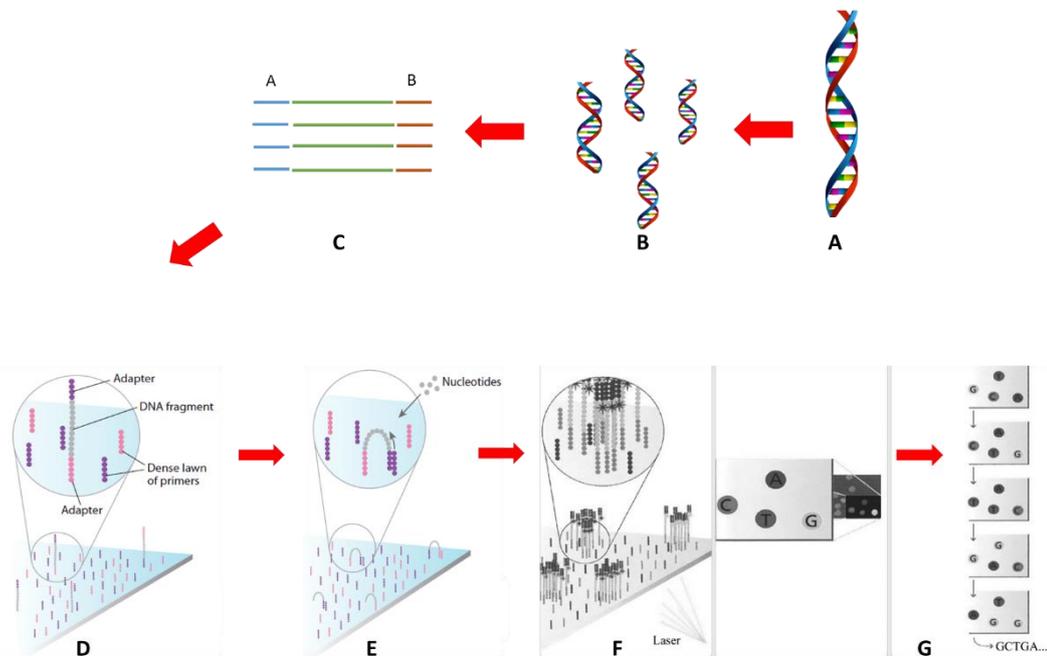


Figura 1: Esquema das etapas do sequenciamento utilizando a plataforma *Illumina*. **A** - Genoma alvo; **B** - Material genético fragmentado (*reads*); **C** - Ligação dos adaptadores nas sequências de DNA; **D** - Ligação dos fragmentos ao suporte sólido; **E** - Formação de pontes, amplificação e formação dos *clusters*; **F** - Emissão de um sinal de luz para cada nucleotídeo adicionado e **G** - Leitura da sequência de nucleotídeos. Fonte: Mardis (2008); Carvalho & Silva (2010) com adaptações.

Com a evolução das metodologias de sequenciamento, foi possível desenvolver uma nova maneira de detecção de patógenos: a “metagenômica”. Metagenoma refere-se a uma abordagem independente de cultivo baseada na investigação das moléculas de DNA de uma mistura de populações microbianas, ou seja, é baseado na análise genômica de DNA microbiano extraído diretamente de amostras ambientais (Handelsman *et al.*, 1998). Esses trabalhos pioneiros tinham como objetivo o desenvolvimento de um método mais direto, global e rápido para acessar a diversidade genética da microflora do solo. Neste sentido, Handelsman *et al.* (1998) propuseram o conceito de clonagem do metagenoma para acessar os genomas coletivos e a maquinaria biossintética desta microflora. A estratégia utilizada por Handelsman *et al.*

(1998), foi isolar o DNA genômico diretamente do solo, cloná-lo em um organismo facilmente cultivável (ex. *Escherichia coli*) e então sequenciar. Em 2005, Kevin Chen & Lior Pachter na Universidade da Califórnia (Berkeley, CA, EUA), também utilizaram a denominação “metagenômica” para a aplicação de técnicas modernas de genômica ao estudo das comunidades de organismos microbianos diretamente em seus ambientes naturais, sem a necessidade de isolamento e de cultivo em laboratório de espécies individuais (Barzon *et al.*, 2013).

A metagenômica, por não depender do conhecimento prévio do genoma viral, tem sido utilizada visando a descoberta e identificação de novas espécies que em sua maioria tem se mostrado filogeneticamente distante dos vírus previamente descritos (Mokili *et al.*, 2012; Gudbergsdóttir *et al.*, 2016; Simmonds *et al.*, 2017). Estes estudos, também são importantes na catalogação da enorme diversidade de vírus em amostras de ambientes aquáticos (Breitbart *et al.*, 2002; Labonté & Suttle, 2013; Coutinho *et al.*, 2016), no estudo da biodiversidade viral em diferentes amostras humanas (Delwart, 2013) e na identificação de patógenos humanos emergentes (Firth & Lipkin, 2013; Palacios *et al.*, 2008).

A primeira aplicação da metagenômica na virologia ocorreu com análise de comunidades virais em amostras de água do mar coletadas em San Diego/EUA, quando Breitbart *et al.* (2002), isolaram partículas virais por centrifugação e filtragem e fizeram extração de DNA, o que lhes permitiu descobrir que a maior parte da diversidade viral encontrada não tinha identidade com as sequências depositadas no banco de dados GenBank. A partir de 2005 vem crescendo a pesquisa na virologia humana e, em 2009, foram realizados os primeiros trabalhos em virologia vegetal (Adams *et al.*, 2009; Al Rwahnih *et al.*, 2009; Kreuze *et al.*, 2009).

Abordagens que diferem de outros estudos metagenômicos têm sido utilizadas por virologistas de plantas no preparo das amostras associadas à diferentes protocolos de

enriquecimento viral para identificar, monitorar e estudar a biodiversidade de vírus. Entre essas abordagens destacam-se: enriquecimento de *virus like particle* (VLP) por centrifugação ou filtração (Melcher *et al.*, 2008; Ng *et al.*, 2011), amplificação por círculo rolante (*rolling circle amplification* – RCA) (Wyant *et al.*, 2012), extração de dsRNA (RNA de fita dupla) (Balijja *et al.*, 2008; Roossinck *et al.*, 2010) e a extração e sequenciamento de pequenos RNAs de interferência (siRNA) (Bi *et al.*, 2012; Kreuze *et al.*, 2009).

Roossink *et al* (2010) realizaram um dos primeiros trabalhos utilizando protocolo de enriquecimento viral seguido de sequenciamento de alto rendimento em plantas, o que chamaram de “ecogenoma” ou “viroma”, para distingui-los daqueles que utilizam amostras ambientais. Esses autores coletaram amostras de gramíneas em pradarias conservadas no nordeste de Oklahoma (área de diversidade vegetal relativamente baixa) e em uma área de Conservação de Guanacaste, no noroeste da Costa Rica (uma área de altíssima diversidade de plantas). As amostras foram processadas com enriquecimento de dsRNA e formaram um *pool* para enviar ao sequenciamento. Roossink *et al.* (2010) observaram que, quando comparadas com sequências disponíveis no GenBank, 70% das amostras apresentaram similaridade com genomas virais.

Na etapa da escolha da plataforma de sequenciamento a ser utilizada em estudo de metagenômica, deve-se levar em consideração, primeiramente, o tamanho do genoma a ser estudado, bem como sua complexidade (quantidade de guanina e citosina), a amplitude da cobertura do genoma e a precisão do processo (Loman *et al.*, 2012). Desta forma, com intuito de acompanhar estes avanços na eficiência do sequenciamento, estão sendo desenvolvidos novos instrumentos de análise dos *reads* com aplicação de bioinformática que requer recursos computacionais ajustados para testes de diagnóstico (Barzon *et al.*, 2013). Os programas utilizados nestas análises permitem o alinhamento das sequências dos *reads*, montagem dos genomas, detecção de polimorfismos e anotação gênica (Barzon *et al.*, 2013).

2. Manejo de vírus de batata-doce por meio de técnicas de cultura de tecidos e termoterapia

A batata-doce por ser uma planta de propagação vegetativa da qual os produtores se utilizam segmentos de ramos ou de hastes para implementação de novos plantios. A multiplicação contínua em condições de campo desse material de propagação vegetativa pode conduzir a um processo conhecido como “degenerescência”, que se caracteriza por uma acentuada perda de vigor e produtividade das plantas devido ao acúmulo de patógenos, principalmente espécies virais (Oliveira *et al.*, 2008). Na batata-doce destacam-se os potyvírus como os principais indutores de “degenerescência”. No entanto, as espécies classificadas no gênero *Begomovirus* são outros vírus que podem ser disseminados rapidamente, dependendo da abundância de populações de mosca branca (Ling *et al.*, 2010).

Uma vez que se tenha conhecimento das espécies virais que infectam a cultura é possível a aplicação de medidas adequadas de controle que, para o caso da batata-doce, pode envolver tanto os programas de limpeza clonal, para regeneração de plantas livres de vírus, como o uso de cultivares resistentes (Fernandes & Dusi, 2013).

A maioria dos programas de desenvolvimento e distribuição em larga escala de material propagativo isento de vírus no mundo foi implementada nos últimos 20 anos (Clark *et al.*, 2012). O processo de cultura de ápices caulinares tem possibilitado aumentos de produtividade (Loebenstein *et al.*, 2009; Clark *et al.*, 2012), pois sua aplicação pode ajudar a diminuir o processo de declínio da cultivar devido à acumulação de vírus e reduz a frequência de mutações somáticas (Alam *et al.*, 2013). Isso ressalta a importância da adoção exclusiva de ramas de alta qualidade fitossanitária para a implantação de uma nova lavoura.

Segundo Allam *et al.* (2013), a batata-doce tem uma base genética muito ampla e a resposta à cultura de tecidos é altamente heterogênea. Portanto, o desenvolvimento de cultivares/clones de elite, o cultivo em várias zonas agroecológicas em combinação com

práticas culturais adequadas que incluem o emprego de materiais indexados aos vírus têm sido importantes fatores para aumentar o potencial de produção dessa cultura.

A limpeza de vírus tem sido feita, geralmente, por cultivo dos tecidos meristemáticos apicais (Alam *et al.*, 2013). Segundo Oliveira *et al.* (2008), dentre os processos utilizados na erradicação de vírus, a cultura de meristemas, incluindo o meristema propriamente dito, tem se mostrado satisfatoriamente eficiente. Torres *et al.* (1996) otimizaram um meio para a obtenção de plantas livres de vírus, que pode ser utilizado para pesquisa com manutenção *in vitro* de germoplasma elite, propagação rápida, produção comercial e intercâmbio. A efetividade da limpeza de vírus é devida à ausência de tecidos vasculares, e rápido crescimento do tecido meristemático, o que impede, de maneira temporária, a invasão de partículas virais (Oliveira *et al.*, 2008). Apesar da possibilidade de ocorrer reinfecção, plantas livres de vírus são o principal material de plantio para a produção de raízes comerciais usado em países como os Estados Unidos (Villordon & La Bonte, 1996).

No Brasil, as variedades de batata-doce comercializadas são predominantemente de cor de polpa branca, amarela e creme. Variedades de polpa alaranjada, as quais são ricas em carotenoides com ação de pró-vitamina A, não são comumente encontradas, sendo o seu consumo, do ponto de vista nutricional, mais interessante (Melo *et al.*, 2010). Os carotenoides são pigmentos naturais responsáveis pelas cores de amarelo a laranja ou vermelho de muitas frutas e hortaliças, (Rodrigues-Amaya *et al.*, 2008). A intensidade de cor está relacionada ao teor de caroteno na raiz da batata-doce o que facilita o processo de identificação de cultivares ricas em beta-caroteno em condições de campo (Silva *et al.*, 2007).

Nutricionistas nos Estados Unidos estão explorando o potencial de batata-doce de polpa roxa na prevenção de câncer pelas propriedades dos flavonoides do grupo das antocianinas, que estão presentes nestas variedades (IPC, 2015). Na África e em muitos países em desenvolvimento o consumo de batata-doce é intenso, fazendo dessa hortaliça uma importante

fonte de beta-caroteno. No Brasil, o consumo da batata-doce é mais popular na Região Nordeste. No entanto, essa raiz tuberosa e as variedades comercializadas na Região são usualmente brancas, ou seja, com baixo conteúdo em carotenoides (Rodriguez-Amaya *et al.*, 2008). Atualmente existem 29 cultivares de batata-doce (**Tabela 4**) registradas no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA (MAPA, 2017), porém há diversas outras cultivares locais que são utilizadas pelos produtores por todo o País.

Tabela 4. Lista de cultivares de batata-doce (*Ipomoea batatas*) registradas no Ministério de Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA)^{1/}

Denominação	Mantenedor	Nº registro
Amanda		22593
Ana Clara		22594
Barbara	Universidade Federal do Tocantins – UFT, TO	22595
Beatriz		22596
Beauregard		26934
Brazlândia Branca		07840
Brazlândia Rosada		07841
Brazlândia Roxa	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Embrapa, DF	07852
BRS Amélia		27313
BRS Cuia		27315
BRS Fepagro Viola	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Embrapa, DF Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária – Fepagro, RS	33889
BRS Gaita		33890
BRS Rubissol	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Embrapa, DF	27314
Carolina Vitória	Universidade Federal do Tocantins – UFT, TO	22597
Coquinho	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Embrapa, DF	07849
Duda	Universidade Federal do Tocantins – UFT, TO	22598
Iapar 69		02322
Iapar 70	Instituto Agronômico do Paraná – Iapar, PR	02323
Izabela		22600
Julia		22599
Livia	Universidade Federal do Tocantins – UFT, TO	22591
Marcela		22592
Princesa	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Embrapa, DF	06495
Scs 367 Favorita		27465
SCS 368 Ituporanga		27464
SCS 369 Aguas Negras		27463
SCS 370 Luiza	Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina – Epagri, SC	32952
SCS 371 Katiy		32953
SCS 372 Marina		32954

^{1/}Ministério de Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) – CultivarWeb, Gerenciamento de Informação (http://sistemas.agricultura.gov.br/snpc/cultivarweb/cultivares_protegidas.php).

Entre os carotenoides presentes em raízes de batata-doce, o beta-caroteno merece especial destaque. Esse composto é o mais potente precursor de vitamina A (retinol) encontrado em plantas (Simonne *et al.*, 1993). Esse pigmento de coloração alaranjada pode, desta forma, servir de fonte vitamínica para o organismo humano, que é capaz de transformar o beta-caroteno em vitamina A. Esta vitamina é essencial para o desenvolvimento dos órgãos da visão, formação da pele e crescimento infantil (Rodriguez-Amaya *et al.*, 2008). Baixos níveis séricos de vitamina A estão associados à maior mortalidade e morbidade, taxas mais lentas de crescimento, aumento da suscetibilidade a infecções, xerofthalmia e cegueira noturna, sobretudo em crianças menores de cinco anos (Villamor & Fawzi, 2005). A deficiência de vitamina A (que é uma das carências nutricionais mais prevalentes no mundo em desenvolvimento) é considerada um problema de Saúde Pública em mais de 70 países. Na América Latina, a deficiência de vitamina A está muitas vezes associada à desnutrição protéico-energética, sendo que, no Brasil, a Região Nordeste é considerada como a área onde o problema se apresenta em maior magnitude (Martins *et al.*, 2004). Estudos epidemiológicos realizados no Nordeste brasileiro têm indicado a prevalência de baixas concentrações de retinol em crianças pré-escolares, chegando a atingir cifras em torno de 55% no Estado da Bahia (Santos *et al.*, 1996). Diversos outros efeitos promotores da saúde também têm sido atribuídos aos carotenoides, tais como: imunomodulação e redução do risco de contrair doenças crônicas degenerativas, como câncer, doenças cardiovasculares, catarata e degeneração muscular relacionada a idade (Mesquita & Torquillo, 2016). Para a realização da análise precisas da diversidade e dos teores dos carotenoides presentes na batata-doce, a técnica analítica mais utilizada é HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) (Silva *et al.*, 2007).

A detecção eficiente e o conhecimento das espécies de vírus que infectam a batata-doce, bem como dos vetores que acometem a cultura, propiciam uma melhor aplicação de medidas de controle de vírus. Além disso, sabendo-se da importância nutritiva da cultura da batata-doce

e de sua relevância, sobretudo para populações de baixa renda e sujeitas à restrição alimentar do Nordeste brasileiro, a disponibilização de clones combinando atributos de qualidade nutricional (ricos em beta-caroteno) e fitossanitária (ex. isentos de vírus) pode beneficiar um grande número de pessoas em uma das regiões geográficas de maior vulnerabilidade alimentar do Brasil.

3. LITERATURA CITADA

ADAMS, M.J.; ANTONIW, J.F. & FAUQUET, C.M. 2005. Molecular criteria for genus and species discrimination within the family *Potyviridae*. *Archives of Virology* 150: 459-479.

ADAMS, I.P.; GLOVER, R.H.; MONGER, W.A.; MUMFORD, R.; JACKEVICIENE, E.; NAVALINSKIENE, M.; SAMUITIENE, M. & BOONHAM, N. 2009. Next-generation sequencing and metagenomic analysis: a universal diagnostic tool in plant virology. *Molecular Plant Pathology* 10: 537-545.

ALAM, I.; SHARMIN, S.A.; NAHER, M.K.; ALAM, M.J.; ANISUZZAMAN, M. & ALAM, M.F. 2013. Elimination and detection of viruses in meristem-derived plantlets of sweetpotato as a low-cost option toward commercialization. *3 Biotech*, 3: 153-164.

ALBUQUERQUE, L.C.; INOUE-NAGATA, A.K.; PINHEIRO, B.; RIBEIRO, S.G.; RESENDE, R.O.; MORIONES, E. & NAVAS-CASTILLO, J. 2011. A novel monopartite *Begomovirus* infecting sweet potato in Brazil. *Archives of Virology* 156:1291-1294.

ALBUQUERQUE, L.C.; INOUE-NAGATA, A.K.; PINHEIRO, B.; RESENDE, R.O.; MORIONES, E. & NAVAS-CASTILLO, J. 2012. Genetic diversity and recombination analysis of sweepviruses from Brazil. *Virology Journal* 9: 241-254.

AL RWAHNIH, M.; DAUBERT, S.; GOLINO, D. & ROWHANI, A. 2009. Deep sequencing analysis of RNAs from a grapevine showing Syrah decline symptoms reveals a multiple virus infection that includes a novel virus. *Virology* 387: 395-401.

ALVAREZ, V.; DUCASSE, D. A.; BIDERBOST, E. & NOME, S. F. 1997. Sequencing and characterization of the coat protein and 3' non-coding region of a new sweet potato potyvirus. *Archives of Virology* 142: 1635-1644.

ATEKA E.M.; BARG E.; NJERU R.W.; LESEMANN D.E. & VETTEN H.J. 2004. Further characterization of 'sweet potato virus 2': A distinct species of the genus *Potyvirus*. *Archives of Virology* 149: 225-239.

BALIJA, A.; KVARNHEDEN, A. & TURCHETTI, T. 2008. A non-phenol-chloroform extraction of double-stranded RNA from plant and fungal tissues. *Journal of Virological Methods* 152: 32-37.

- BARBA, M.; CZOSNEK, H. & HADIDI, A. 2014. Historical Perspective, Development and Applications of Next-Generation Sequencing in Plant Virology. *Viruses* 6: 106-136.
- BARBOSA, L.M.M.A.; DANTAS, I.C.; FELISMINO, D.C. & COSTA-SOBRINHA, L. 2012. Levantamento taxonômico da família Convolvulaceae no Sítio Imbaúba, Lagoa Seca, Paraíba. *BioFar: Revista de Biologia e Farmácia* 8.
- BARZON, L.; LAVEZZO, E.; COSTANZI, G.; FRANCHIN, E.; TOPPO, S. & PALÙ, G. 2013. Next-generation sequencing technologies in diagnostic virology. *Journal of Clinical Virology* 58: 346-350.
- BENTLEY, D.R. 2006. Whole-genome re-sequencing. *Current Opinion in Genetics & Development* 16: 545-552.
- BI, Y.; TUGUME, A.K. & VALKONEN, J.P.T. 2012. Small-RNA Deep Sequencing Reveals *Arctium tomentosum* as a Natural Host of *Alstroemeria virus X* and a New Putative *Emaravirus*. *PloS One* 7, e42758.
- BREITBART, M.; SALAMON, P.; ANDRESEN, B.; MAHAFFY, J.M.; SEGALL, A.M.; MEAD, D.; AZAM, F. & ROHWER, F. 2002. Genomic analysis of uncultured marine viral communities. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99: 14250-14255.
- BROWN, J. D.; BRUNT, A. A. & HUGO, S. A. 1988. Studies on viruses isolated from sweet potato (*Ipomoea batatas*). Report of the Glasshouse Crops Research Institute for 1986-8: 104-108.
- BROWN, J.K.; ZERBINI, F.M.; NAVAS-CASTILLO, J.; MORIONES, E.; RAMOS-SOBRINHO, R.; SILVA, J.C.F.; FIALLO-OLIVE, E.; BRIDDON, R. W.; HERNÁNDEZ-ZEPEDA, C.; IDRIS, A.; MALATHI, V.G.; MARTIN, D.P.; RIVERA-BUSTAMANTE, R.; UEDA, S. & VARSANI, A. 2015. Revision of *Begomovirus* taxonomy based on pairwise sequence comparisons. *Archives of Virology* 160: 1593-1619.
- CAO, M.; LAN, P.; LI, F.; ABAD, J.; ZHOU, C. & LI, R. 2017. Genome characterization of sweet potato symptomless virus 1: a mastrevirus with an unusual nonanucleotide sequence. Annotated Sequence Record. *Archives of Virology* 162: 2881-2884.
- CARVALHO, M.C.C.G. & SILVA, D.C.G. 2010. Sequenciamento de DNA de nova geração e suas aplicações na genômica de plantas. *Ciência Rural* 40: 735-744.
- CASTRO, L.A.S.; ROCHA, N.E.M. & ABRANTES, V.L. 2008. Avaliação biológica de viroses em plantas matrizes e mudas de batata-doce (*Ipomoea batatas*). *Circular Técnica*, 75: Embrapa Clima Temperado.
- CASTRO, B.M.C.; SOARES, M.A.; ANDRADE JÚNIOR, V.C. & PIRES, E.M. 2013. Batata-doce (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.): Um novo hospedeiro para *Brevicoryne brassicae* (L.) e *Myzus persicae* (Sulzer) (Hemiptera: Aphididae). *Comunicata Scientiae* 4: 220-223.
- CENTRO INTERNACIONAL DE LA PAPA. Sweet potato. 2015. Disponível em:<<http://cipotato.org/sweetpotato>>. Acesso em: 17 de Nov. 2017.

CLARK, C.A.; DAVIS, J.A.; ABAD, J.A.; CUELLAR, W.J.; FUENTES, S.; KREUZE, J.F.; GIBSON, R.W.; MUKASA, S.B.; TUGUME, A.K.; TAIRO, F.D. & VALKONEN, J.P.T. 2012. Sweetpotato Viruses: 15 Years of Progress on Understanding and Managing Complex Diseases. *Plant Disease* 96: 168-185.

CHAVES, A.L.R.; EIRAS, M.; RODRIGUES, L.K.; RAMOS, A.F. & COLARICCIO, A. 2017. First report of Tomato mottle leaf curl virus infecting tomato in São Paulo State, Brazil. *Summa Phytopathologica* 43: 353.

COUTINHO, F.H.; SILVEIRA, C.B.; GREGORACCI, G.B.; THOMPSON, C.C.; EDWARDS, R.A.; BRUSSAARD, C.P.D.; DUTILH, B.E. & THOMPSON, F.L. 2016. Marine viruses discovered via metagenomics shed light on viral strategies throughout the oceans. *Nature Communications* | 8:15955 | DOI: 10.1038/ncomms15955.

CUELLAR, W.J.; DE SOUZA, J.; BARRANTES, I.; FUENTES, S. & KREUZE, J.F. 2011. Distinct cavemoviruses interact synergistically with sweet potato chlorotic stunt virus (genus: *Crinivirus*) in cultivated sweet potato. *Journal of General Virology* 92: 1233-1243.

CUELLAR, W.J.; SOUZA, J.; BARRANTES, I.; FUENTES, S. & KREUZE, F. 2011. Distinct cavemoviruses interact synergistically with sweet potato chlorotic stunt virus (genus *Crinivirus*) in cultivated sweet potato. *Journal of General Virology* 92: 1233-1243.

CUELLAR, W.J.; GALVEZ, M.; FUENTES, S.; TUGUME, J. & KREUZE, J. 2015. Synergistic interactions of begomoviruses with *Sweet potato chlorotic stunt virus* (genus *Crinivirus*) in sweet potato (*Ipomoea batatas* L.). *Molecular Plant Pathology* 16: 459-471.

DELWART, E. 2013. A roadmap to the human virome. *PLoS pathogens* 9, e1003146.

DE SOUZA, J.; FUENTES, S.; SAVENKOV, E.I.; CUELLAR, W. & KREUZE, J.F. 2013. The complete nucleotide sequence of sweet potato C6 virus: a carlavirus lacking a cysteine-rich protein. *Archives of Virology* 158: 1393-1396.

FAUQUET, C.M.; BRIDDON, R.W.; BROWN, J.K.; MORIONES, E.; STANLEY, J.; ZERBINI, M. & ZHOU, X. 2008. Geminivirus strain demarcation and nomenclature. *Archives of Virology* 153: 783-821.

FERNANDES, F.R. 2013. Limpeza clonal de batata-doce: produção de matrizes com elevada qualidade fitossanitária. *Circular Técnica*, 117.

FERNANDES, F.R.; ALVES, R.C. & SOUZA, J.M. 2012. Diversidade viral associada à batata-doce no Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa Hortaliças. *Tropical Plant Pathology* 37 (Suplemento), 45º Congresso Brasileiro de Fitopatologia - Manaus, AM.

FERNANDES, F.R. & DUSI, A.N. 2013. Viroses da batata-doce no Brasil: importância e principais medidas de controle. *Circular Técnica*: 126.

FIALLO-OLIVÉ, E.; MOHAMMED, I.U.; TURAKI, A.A.; MUHAMMAD, A. & NAVAS-CASTILLO, J. 2017. A Novel Strain of the Mastrevirus *Chickpea chlorotic dwarf virus* Infecting Papaya in Nigeria. *Plant Disease* 101: 1684

FIRTH, C. & LIPKIN, W.I. 2013. The genomics of emerging pathogens. Annual review of genomics and human genetics 14: 281-300.

FILGUEIRA, F.A.R. 2008. Novo manual de olericultura:agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças. 3. ed. Viçosa, MG: UFV, 421p.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. Faostat 2014. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567#ancor>>. Acesso em: 11 de Nov. 2017.

FUENTES, S.; MAYO, M.A.; JOLLY, C.A.; NAKANO, M.; QUERCI, M. & SALAZAR, L. F. 1996. A novel luteovirus from sweet potato, sweet potato leaf speckling virus. Annals of Applied Biology 128: 491-504.

FUENTES, S. & SALAZAR, L. 2003. First report of *Sweet potato leaf curl virus* in Peru. Plant Disease, Saint Paul, v. 87.

GIBBS, A. & OHSHIMA, K. 2010. Potyviruses and the digital revolution. Annual Review Phytopathology 48: 205-223.

GIBSON, R.W. & KREUZE, J.F. 2015. Degeneration in sweetpotato due to viruses, virus-cleaned planting material and reversion: a review. Plant Pathology 64: 1-15.

GUDBERGSDÓTTIR, S.R.; MENZEL, P.; KROGH, A.; YOUNG, M. & PENG, X. 2016. Novel viral genomes identified from six metagenomes reveal wide distribution of archaeal viruses and high viral diversity in terrestrial hot springs. Environmental Microbiology 18: 863-874.

HANDELSMAN, L., J.; RONDON, M.R.; BRADY, S.F.; CLARDY, J. & GOODMAN, R.M. 1998. Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products. Chemistry & Biology 5: 245-249.

HANLEY-BOWDOIN, L.; SETTLAGE, S.B.; OROZCO, B.M.; NAGAR, S. & ROBERTSON, D. 2000. Geminiviruses: models for plant DNA replication, transcription, and cell cycle regulation. Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology 35: 105-40.

IBGE. PRODUÇÃO AGRÍCOLA MUNICIPAL: Culturas temporárias e permanentes. 2016. Disponível em: <https://sidra.ibge.gov.br/pesquisa/pam/tabelas>. Acesso em: 11 Nov. 2017.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Culturas temporárias 2016. Disponível em:< <https://cidades.ibge.gov.br/pesquisas>>. Acesso em: 17 de Nov. 2017.

INSTITUTO DE PESQUISAS JARDIM BOTÂNICO DO RIO DE JANEIRO. *Ipomoea* in Flora do Brasil 2020 em construção. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB7021>>. Acesso em: 11 Nov. 2017.

- KWAK, H.R.; KIM, J.; KIM, M.K.; SEO, J. K.; JUNG, M.N.; KIM, J. S.; LEE, S. & CHOI, H. S. 2015. Molecular Characterization of Five Potyviruses Infecting Korean Sweet Potatoes Based on Analyses of Complete Genome Sequences. *The Plant Pathology Journal* 31: 388-401.
- KWAK, H.R.; KIM, M.K.; SHIN, J.C.; LEE, Y.J.; SEO, J.K.; LEE, H.U.; JUNG, M.N.; KIM, S.H. & CHOI, H.S. 2014. The current incidence of viral disease in Korean sweet potatoes and development of multiplex RT-PCR assays for simultaneous detection of eight sweet potato viruses. *The Plant Pathology Journal* 30: 416-424.
- KASHIF, M.; PIETILÄ, S.; ARTOLA, K.; JONES, R.A.C.; TUGUME, A.K.; MÄKINEN, V. & VALKONEN, J.P.T. 2012. Detection of Viruses in Sweetpotato from Honduras and Guatemala Augmented by Deep-Sequencing of Small-RNAs. *Plant Disease* 96: 1430-1437.
- KREUZE, J.F.; PEREZ, A.; UNTIVEROS, M.; QUISPE, D.; FUENTES, S. & BARKER, I.; SIMON, R. 2009. Complete viral genome sequence and discovery of novel viruses by deep sequencing of small RNAs: A generic method for diagnosis, discovery and sequencing of viruses. *Virology* 388: 1-7.
- KROTH, L.L.; FUENTES, S.; SALAZAR, L.F. & DANIELS, J. 2001. Detecção sorológica de vírus por ncm-elisa em lavouras de batata-doce no Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. *Revista Brasileira de Agrociência* 7: 117-119.
- LABONTÉ, J.M. & SUTTLE, C.A. 2013. Metagenomic and whole-genome analysis reveals new lineages of gokushoviruses and biogeographic separation in the sea. *Frontiers in Microbiology* 4: 404.
- LI, F.; XU, D.; ABAD, J. & LI, R. 2012. Phylogenetic relationships of closely related potyviruses infecting sweet potato determined by genomic characterization of *Sweet potato virus G* and *Sweet potato virus 2*. *Virus Genes* 45: 118-125.
- LIAO, C.H.; CHIEN, K.; CHUNG, M.L.; CHIU, R.J. & HAN, Y.H. 1979. A study on sweetpotato virus disease in Taiwan. I. Sweet potato yellow spot virus disease. *Journal of Agricultural Research* 28: 127-137.
- LING, K.S.; JACKSON, D.M.; HARRISON, H.; SIMMONS, A.M. & PESIC-VAN ESBROECK, Z. 2010. Field evaluation of yield effects on the U.S.A. heirloom sweetpotato cultivars infected by *Sweet potato leaf curl virus*. *Crop Protection* 29: 757-765.
- LOEBENSTEIN, G.; THOTTAPPILLY, G.; FUENTES, S. & COHEN, J. 2009. Virus and phytoplasma diseases. In: G. Loebenstein and G. Totthappilly (eds). *The Sweetpotato*. Springer Sciences Business Media BV, Dordrecht, The Netherlands. Pages 105-134.
- LOMAN, N.J.; MISRA, R.V.; DALLMAN, T.J.; CONSTANTINIDOU, C.; GHARBIA, S.E.; WAIN, J. & PALLEN, M.J. 2012. Performance comparison of benchtop high-throughput sequencing platforms. *Nature Biotechnology* 30: 434-439.
- LOZANO, G.; TRENADO, H.P.; VALVERDE, R.A. & NAVAS-CASTILLO, J. 2009. Novel begomovirus species of recombinant nature in sweet potato (*Ipomoea batatas*) and *Ipomoea indica*: taxonomic and phylogenetic implications. *Journal of General Virology* 90: 2550-2562.

LUAN, Y.S.; ZHANG, J.; LIU, D.M. & LI, W.L. 2007. Molecular characterization of sweet potato leaf curl virus isolate from China (SPLCV-CN) and its phylogenetic relationship with other members of the *Geminiviridae*. *Virus Genes* 35: 379-385.

MACEDO, M.A.; ALBUQUERQUE, L.C.; MALIANO, M.R.; SOUZA, J.O.; ROJAS, M.R.; INOUE-NAGATA, A.K. & GILBERTSON, R.L. 2017. Characterization of tomato leaf curl purple vein virus, a new monopartite New World begomovirus infecting tomato in Northeast Brazil. *Archives of Virology* DOI doi.org/10.1007/s00705-017-3662-0.

MAINA, S.; BARBETTI, M.J.; EDWARDS, O.R.; ALMEIDA, L.; XIMENES, A. & JONES, R.A.C. 2018. *Sweet potato feathery mottle virus* and *Sweet potato virus C* from East Timorese and Australian Sweetpotato: Biological and Molecular Properties, and Biosecurity Implications. *Plant Disease* 102: 589-599.

MARDIS, E.R. 2008. Next-Generation DNA Sequencing Methods. *Annual Review of Genomics and Human Genetics* 9: 387-402.

MARTINS, M.C.; SANTOS, L.M.P. & ASSIS, A.M.O. 2004. Prevalência de hipovitaminose A em pré-escolares no estado de Sergipe, 1998. *Revista de Saúde Pública* 38: 537-542.

MELCHER, U.; MUTHUKUMAR, V.; WILEY, G.B.; MIN, B.E.; PALMER, M.W.; VERCHOT-LUBICZ, J.; ALI, A.; NELSON, R.S.; ROE, B.A.; THAPA, V. & PIERCE, M.L. 2008. Evidence for novel viruses by analysis of nucleic acids in virus-like particle fractions from *Ambrosia psilostachya*. *Journal of Virological Methods* 152: 49-55.

MELO, W.F.; SILVA, J.B.C. & MOITA, A.W. 2010. Avaliação da produtividade de materiais de batata-doce ricos em provitamina A junto a agricultores familiares. *Horticultura Brasileira* 28: S2302-S2306.

MELGAREJO, T.A.; KON, T.; ROJAS, M.R.; PAZ-CARRASCO, L.; ZERBINI, F.M. & GILBERTSON, R.L. 2013. Characterization of a New World Monopartite Begomovirus Causing Leaf Curl Disease of Tomato in Ecuador and Peru Reveals a New Direction in Geminivirus Evolution. *Journal of Virology* 87: 5397-5413.

MESQUITA, G.F. & TORQUILHO, H.S. 2016. O uso dos carotenóides para promoção da saúde. *Perspectivas da Ciência e Tecnologia* 8: 1-28.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO (MAPA). Cultivar Web. Gerenciamento de Informação. 2017. Disponível em: <http://extranet.agricultura.gov.br/php/snpc/cultivarweb/cultivares_registradas.php> Acesso em: 10 de nov de 2017.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO (MAPA). Novas cultivares de batata-doce da Embrapa chegam ao mercado. 2011. Disponível em: <<http://www.brasil.gov.br/governo/2011/06/novas-cultivares-de-batata-doce-da-embrapa-chegam-ao-mercado>> Acesso em: 10 de nov de 2017.

MIYAMOTO, B.C.B.; SOUZA, R.F.; SILVEIRA, J.M.F.J. & JUNIOR, J.J.S. 2017. Análise da produção científica sobre o mosaico-dourado do feijoeiro. *Revista de política agrícola* 26: 79-95.

MOKILI, J.L.; ROHWER, F. & DUTILH, B.E. 2012. Metagenomics and future perspectives in virus discovery. *Current Opinion in Virology* 2: 63-77.

MORALES, F.J. & ANDERSON, P.K. 2001. The emergence and dissemination of whitefly-transmitted geminiviruses in Latin America. *Archives of Virology* 146: 415-441.

MULABISANA, M.J.; LOETE, M.C.; MABASA, K.G.; LAURIE, S.M.; OELOFSE, D.; ESTERHUIZEN, L.L. & REY, M.E.C. 2018. Surveys in the Gauteng, Limpopo and Mpumalanga provinces of South Africa reveal novel isolates of sweet potato viroses. *South African Journal of Botany* 114: 280-294.

NAVAS-CASTILLO, J.; FIALLO-OLIVÉ E. & SÁNCHEZ-CAMPOS S. 2011. Emerging Virus Diseases Transmitted by Whiteflies. *Annual Review of Phytopathology* 49: 49.

NG, T.F.; DUFFY, S.; POLSTON, J.E.; BIXBY, E.; VALLAD, G.E. & BREITBART, M. 2011. Exploring the diversity of plant DNA viruses and their satellites using vector-enabled metagenomics on whiteflies. *PloS One* 6: e19050.

NUNES, M.U.C.; CRUZ, D.P. & FORTUNA, A. 2012. Tecnologia para produção de farinha de batata-doce: novo produto para os agricultores familiares. *Circular técnica* 65. Embrapa: Aracaju, SE.

OLIVEIRA, M.K.T.; NETO, F.B.; CÂMARA, F.A.; DOMBROSKI, J.L.D. & FREITAS, R.M. O. 2008. Multiplicação in vitro de batata-doce (*Ipomoea batatas* Lam). *Revista Caatinga* 21: 129-134.

OLIVEIRA, A.P.; GONDIM, P.C.; SILVA, O.P.R.; OLIVEIRA, A.N.P.; GONDIM, S.C. & SILVA, J.A. 2013. Produção e teor de amido da batata-doce em cultivo sob adubação com matéria orgânica. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental* 17: 830-834.

PALACIOS, G.; DRUCE, J.; DU, L.; TRAN, T.; BIRCH, C.; BRIESE, T.; CONLAN, S.; QUAN, P.L.; HUI, J.; MARSHALL, J.; SIMONS, J.F.; EGHOLM, M.; PADDOCK, C.D.; SHIEH, W.J.; GOLDSMITH, C.S.; ZAKI, S.R.; CATTON, M. & LIPKIN, W.I. 2008. A new arenavirus in a cluster of fatal transplant-associated diseases. *The New England Journal of Medicine* 358: 991-998.

PAPROTKA, T.; BOITEUX, L.S.; FONSECA, M.E.N.; RESENDE, R.O.; JESKE, H.; FARIA, J.C. & RIBEIRO, S.G. 2010. Genomic diversity of sweet potato geminiviruses in a Brazilian germplasm bank. *Virus Research* 149: 224-233.

PEDROSA, C.E.; ANDRADE JÚNIOR, V.C.; PEREIRA, R.C.; DORNAS, M.F.S.; AZEVEDO, A.M. & FERREIRA, M.A.M. 2015. Yield and quality of wilted sweet potato vines and its silages. *Horticultura Brasileira* 33: 283-289.

PEIXOTO, N. & MIRANDA, J.E.C. 1984. O cultivo da batata-doce em Goiás. Goiânia. ENGOPADDI, 24 p. (ENGOPA. Circular técnica, 7).

PIO-RIBEIRO, G.; MARIANO, R.L.R.; PEREIRA-CARVALHO, R.C.; SOUZA, E.B.; MELO FILHO, P.A. 2016. Doenças da batata-doce. *In*: AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M;

BERGAMIN FILHO, A. & CAMARGO, L.E.A. Manual de Fitopatologia – Doenças das plantas cultivadas. 5ª ed. Ceres. Ouro Preto. p. 149-158.

PIO-RIBEIRO, G.; WINTER, S.; HAMILTON, R.I. ASSIS FILHO, F.M. & DA PAZ, C.D. 1994. First Report of Sweetpotato Virus Disease-Associated *Closterovirus* in Brazil. Disease Note.

POLSTON, J.E.; DE BARRO, P. & BOYKIN, L.M. 2014. Transmission specificities of plant viruses with the newly identified species of the *Bemisia tabaci* species complex. Pest Management Science, DOI: 10.1002/ps.3738.

POZZER, L.; SILVA, J.B.C. & DUSI, A.N. 1992. Avaliação de perdas por virose no cultivo da batata-doce. Horticultura Brasileira 10: 65.

RODRIGUEZ-AMAYA, D.B.; KIMURA, M.; AMAYA-FARFAN, J. 2008. Fontes Brasileiras de Carotenóides. Ministério do Meio Ambiente – MMA.

ROOSSINCK, M.J.; SAHA, P.; WILEY, G.B.; QUAN, J.; WHITE, J.D.; LAI, H.; CHAVARRÍA, F.; SHEN, G. & ROE, B.A. 2010. Ecogenomics: using massively parallel pyrosequencing to understand virus ecology. Molecular Ecology 19: 81-88.

RÓS, A.B.; NARITA, N.; HIRATA, A.C.S. & SANTOS, H.S. 2011. Produtividade de plantas de batata-doce oriundas de matrizes livres de vírus. Horticultura Brasileira 29: 2, S1700- S1706.

SANGER, F.; AIR, G.M.; BARRELL, B.G.; BROWN, N.L.; COULSON, A.R.; FIDDES, J. C.; HUTCHISON, C.A.; SLOCOMBE, P.M. & SMITH, M. 1977a. Nucleotide sequence of bacteriophage phX174DNA. Nature 265: 687-695.

SANGER, F.; NICKLEN, S. & COULSEN, A.R. 1977b. DNA sequencing with chain-terminator inhibitors. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 74: 5463-5467.

SANTOS, L.M.P.; ASSIS, A.M.O.; MARTINS, M.C.; ARAÚJO, M.P.N.; MORRIS, S.S. & BARRETO, M.L. 1996. Situação nutricional e alimentar de pré-escolares no semi-árido da Bahia (Brasil): II Hipovitaminose A. Revista de Saúde Pública 30: 67-74.

SANTOS, J.F.; BRITO, L.M.P.; OLIVEIRA, M.M.; OLIVEIRA, M.E.C. & SANTOS, M.C.C. A. 2009. Produtividade de batata-doce em função de cultivares e sistema de plantio. Tecnologia & Ciência Agropecuária 3: 27-30.

SCHULTZ, A.R. 1968. Introdução ao estudo da botânica sistemática. 3 ed. Porto Alegre; Globo, v.2.

SILVA, E.D.; CUNHA, J.F.; FONSECA, M.E.N.; BOITEUX, L.S. & SILVA, J.B.C. 2007. Correlação entre conteúdo de carotenóides totais e colorimetria em acessos de batata-doce com raízes de diferentes colorações de polpa. Horticultura Brasileira 25: 1. (CD Rom).

SILVA, J.B.C.; LOPES, C.A. & MAGALHÃES, J.S. 2008. Batata-doce (*Ipomoea batatas*). Embrapa Hortaliças. Sistemas de Produção. Disponível em: <

https://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Batata-doce/Batata-doce_Ipomoea_batatas/apresentacao.html>. Acesso em 12 de Dez. de 2017.

SIMÃO-BIANCHINI, R. & FERREIRA, P.P.A. 2015. Ipomoea in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB7021>>. Acesso em 12 de Dez. de 2017.

SOSSAH, F.L.; APPIAH, A.S.; ODURO, V.; AMOATEY, H.M.; OWUSU, G.K.; OPPONG, A.; LAMPTEY, J.N.L.; CAREY, E.E. & FUENTES, S. 2015. Incidence of sweet potato viruses in the coastal savannah agro-ecological zone of Ghana. *Journal of Plant Pathology*: 97: 109-117.

SIMMONDS, P.; ADAMS, M.J.; BENKO, M.; BREITBART, M.; BRISTER, J.R.; CARSTENS, E.B.; DAVISON, A.J.; DELWART, E.; GORBALENYA, A.E.; HARRACH, B.; HULL, R.; KING, A.M.Q.; KOONIN, E.V.; KRUPOVIC, M.; KUHN, J.H.; LEFKOWITZ, E.J.; NIBERT, M.L.; ORTON, R.; ROOSSINCK, M.J.; SABANADZOVIC, S.; SULLIVAN, M.B.; SUTTLE, C.A.; TESH, R.B.; VAN DER VLUGT, R.A.; VARSANI, A. & ZERBINI, F.M. 2017. Virus taxonomy in the age of metagenomics. *Nature Reviews | Microbiology* 15: 161.

SIMONNE, A.H.; KAYS, S.J.; KOEHLER, P.E. & EILENMILLER, R.R. 1993. Assessment of β -carotene content in sweetpotato breeding lines in relation to dietary requirements. *Journal of Food Composition and Analysis* 6: 336-345.

SOUZA, C.A. 2013. Detecção de begomovírus e ipomovírus em genótipos de batata-doce nos Estado de Pernambuco e Paraíba e análise de fontes de resistência a *Tomato chlorotic mottle virus* e *Potato virus Y* em berinjela. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, Brasil.

SOUZA, C.A.; ROSSATO, M.; MELO, F.L. & PEREIRA-CARVALHO, R.C. 2017. Complete Genome Sequences of *Sweet potato feathery mottle virus* and *Sweet potato virus G* from Brazil. *Genome Announcements* 6: e01567-17.

TRENADO, H.P.; ORÍLIO, A.F.; MÁRQUEZ-MARTÍN, B.; MORIONES, E. & NAVAS-CASTILLO, J. 2011. Sweepviruses cause disease in sweet potato and related *Ipomoea* spp.: Fulfilling Koch's postulates for a divergent group in the genus *Begomovirus*. *PLoS One* 6

TOMAR, S.; SHARMA, S. & MALIK, K. 2017. Life parameters of whitefly (*Bemisia tabaci*, gen.) on different host plants. *Indian Journal of Scientific Research* 16: 34-37.

TORRES, A.C.; TEIXEIRA, D.M.C.; MOITA, A.W. & CAMPOS, M.A.C. 1996. Recuperação de plantas de batata-doce livres de vírus a partir da regeneração direta de ápices caulinares. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal* 8: 209- 213.

UNTIVEROS, M.; FUENTES, S. & SALAZAR, L.F. 2007. Synergistic Interaction of Sweet potato chlorotic stunt virus (*Crinivirus*) with Carla-, Cucumo-, Ipomo-, and Potyvirus Infecting Sweet Potato. *Plant Disease* 91: 669-676.

VALVERDE, R.A.; SIM, J. 7 LOTRAKUL, P. 2004. Whitefly transmission of sweet potato viruses. *Virus Research* 100: 123-128.

- VELHO, L.C.F.L. 2016. Avaliação da retenção de nutrientes, aspectos sensoriais e microbiológicos de batata-doce (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) submetida a diferentes métodos de cocção. Dissertação. Universidade Federal do Ceará. Fortaleza, Brasil.
- VILLAMOR, E. & FAWZI, W.W. 2005. Effects of vitamin A supplementation on immune responses and correlation with clinical outcomes. *Clinical Microbiology Reviews* 18: 446-464.
- VILLORDON, A.Q. & LA BONTE, D.R. 1996. Genetic variation among sweetpotatoes propagated through nodal and adventitious sprouts. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 121: 170-174.
- WANG, Y.J.; ZHANG, D.S.; ZHANG, Z.C.; WANG, S.; QIAO, Q.; QIN, Y.H. & TIAN, Y.T. 2015. First report on sweetpotato symptomless virus 1 (genus *Mastrevirus*, family *Geminiviridae*) in sweetpotato in China. *Plant Disease* 99: 1042.
- WYANT, P.S.; STROHMEIER, S.; SCHAFER, B.; KRENZ, B.; ASSUNCAO, I.P.; LIMA, G.S. & JESKE, H. 2012. Circular DNA genomics (circomics) exemplified for geminiviruses in bean crops and weeds of northeastern Brazil. *Virology* 427: 151-157.
- WYLIE, S.J.; ADAMS, M.; CHALAM, C.; KREUZE, J.; LÓPEZ-MOYA, J.J.; OHSHIMA, K.; PRAVEEN, S.; RABENSTEIN, F.; STENGER, D.; WANG, A.; ZERBINI, F.M. & ICTV REPORT CONSORTIUM. 2017. ICTV Virus Taxonomy Profile: *Potyviridae*. *Journal of General Virology* 98: 352-354.
- ZAAGUERI, T.; MNARI-HATTAB, M.; ZAMMOURI, S., HAJLAOUI, M.R.; ACCOTTO, G.P. & VAIRA, A.M. 2017. First Report of *Chickpea chlorotic dwarf virus* in Watermelon (*Citrullus lanatus*) in Tunisia. *Plant Disease* 101: 392.
- ZERBINI, F.M.; BRIDDON, R.W.; IDRIS, A.; MARTIN, D.N.P.; MORIONES, E.; NAVAS-CASTILLO, J.; RIVERA-BUSTAMANTE, R.; ROUMAGNAC, P. & VARSANI, A. 2017. ICTV Virus Taxonomy Profile: *Geminiviridae*. *Journal of General Virology* 98: 131-133.

CAPÍTULO 2

**VIROMA E EFEITO DE FILTRAGEM DE ENXERTIA DE *IPOMOEA*
BATATAS EM *IPOMOEA SETOSA* EM RELAÇÃO À TRANSLOCAÇÃO
DE ESPÉCIES DE VÍRUS**

Viroma e efeito de filtro de enxertia de *Ipomoea batatas* em *Ipomoea setosa* em relação à translocação de espécies de vírus

RESUMO

O cultivo de batata-doce (*Ipomoea batatas* L) é amplamente realizado por propagação vegetativa utilizando-se ramos-semente, hábito que proporciona um aumento na incidência de infecção viral pela reprodução vegetativa contínua da planta. No Brasil, a batata doce é cultivada em todas as regiões com a principal importância para o Nordeste, onde é muito consumida pela população. Os objetivos deste capítulo foram aplicar a análise metagenômica pelo sequenciamento de *Illumina* para estimar a diversidade viral em amostras de batata-doce obtidas de diferentes regiões do Brasil e avaliar a presença viral após enxertia em *I. setosa*. Para isso, foram utilizadas 100 amostras de batata-doce coletadas em diferentes regiões produtoras. Um processo de enriquecimento de vírus foi conduzido utilizando uma centrifugação diferencial onde a massa de tecido foliar de cada planta foi padronizada para 1 g tendo como objetivo formar uma amostra composta. Um procedimento similar foi realizado a partir amostras foliares de *I. setosa*. Depois disso, a extração de RNA foi realizada usando o reagente TRIzol (Invitrogen) e a extração de DNA foi realizada pelo método CTAB. Os ácidos nucleicos purificados foram enviados para o sequenciamento *Illumina HiSeq*. Foram produzidas quatro bibliotecas: RNA de *I. batatas*, RNA de *I. setosa*, DNA de *I. batatas* e DNA de *I. setosa*. Nas bibliotecas de batata-doce foram detectadas três espécies do gênero *Begomovirus* (família *Geminiviridae*), uma espécie gênero *Mastrevirus* (família *Geminiviridae*), uma espécie gênero *Crinivirus* (família *Closteroviridae*), três espécies do gênero *Potyvirus* (família *Potyviridae*) e uma espécie do gênero *Carlavirus* (família *Betaflexiviridae*. Na biblioteca de *I. setosa*, foram detectadas duas espécies do gênero *Begomovirus*, uma espécie gênero *Crinivirus*, três espécies do gênero *Potyvirus* e uma espécie do gênero *Carlavirus*, sugerindo um efeito de filtragem viral da espécie *I. setosa*.

Palavras-chave: batata-doce, metagenômica, *Illumina*

Viroma and grafting filter effect of *Ipomoea batatas* on *Ipomoea setosa* in relation to the translocation of virus species

ABSTRACT

The sweet potato (*Ipomoea batatas* L) is a vegetatively propagated vegetable crop. The continuous clonal propagation of sweet-potato cultivars allows for an increase in the incidence of systemic viral infection. In Brazil, the sweet potato is cultivated in all geographic regions with the main importance for the Northeast area, where it is an important source of nutrients for the local population. The main objectives of the present work were the application of metagenomics analysis (employing an *Illumina* platform) aiming to estimate the viral diversity in sweet potato samples obtained across different geographic regions of Brazil. In addition, it was carried out a study aiming to identify potential virus filtering effects of grafting sweet-potato unto *I. setosa*. For this, 100 sweet-potato samples were collected in different producing regions across Brazil. A virus enrichment process was conducted using a differential centrifugation. The leaf tissue of each plant was standardized to 1 g, aiming to form a pooled sample. A similar procedure was performed with leaf samples of *I. setosa*. After that, the RNA extraction was performed using TRIzol reagent (Invitrogen) and DNA extraction was performed by the CTAB method. Purified nucleic acids were sent for sequencing in an *Illumina HiSeq* platform. Four contrasting libraries were produced: RNA of *I. batatas*, RNA of *I. setosa*, DNA of *I. batatas* and DNA of *I. setosa*. In the sweet potatoes libraries were detected three species of the genus *Begomovirus* (family *Geminiviridae*), a species of the genus *Mastrevirus* (family *Geminiviridae*), a species from the genus *Crinivirus* (family *Closteroviridae*), three species of the genus *Potyvirus* (*Potyviridae*) and a species of the genus *Carlavirus* (family *Betaflexiviridae*). In the library of *I. setosa*, were identified two species of the genus *Begomovirus*, a species of the genus *Crinivirus*, three species of the genus *Potyvirus* and a species of the genus *Carlavirus*, suggesting an effect of viral filtration species *I. setosa*.

Keywords: sweet potato, metagenomic, Illumina

1. INTRODUÇÃO

A batata-doce [*Ipomoea batatas* L. (Lam.)] (Schultz, 1968) é uma espécie vegetal originária das Américas, mais especificamente da faixa do México ao norte da América do Sul (Austin, 1977). Esta espécie pertence à família Convolvulaceae e é a única espécie que tem cultivo com expressão econômica dentro dessa família botânica (Castro *et al.*, 2008).

O cultivo de batata-doce tem importância mundial e ocupa o sétimo lugar entre as culturas mais relevantes depois do trigo, arroz, milho, batata, cevada e mandioca. Segundo dados mais recentes da FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations (2014), o Brasil ocupa a 18ª posição no *ranking* mundial de produção, chegando a produzir 525.814 toneladas por ano (Faostat, 2014, Vargas *et al.*, 2017).

A Região Sul do Brasil se destaca principalmente devido ao fato do Estado do Rio Grande do Sul ser o maior produtor de batata-doce do País. No entanto, é a Região Nordeste que detém maior índice de consumo per capita, devido à batata-doce ser bem apreciada e amplamente consumida pela população, além de apresentar características comerciais favoráveis aos pequenos produtores, como rusticidade e facilidade de cultivo além de representar uma importante fonte de nutrientes para a dieta humana (Oliveira *et al.*, 2013). No Nordeste, os maiores Estados produtores são: Sergipe (35.086 t/ha), Ceará (28.605 t/ha) e Paraíba (28.065 t/ha) (IBGE, 2016).

O principal meio de propagação da batata-doce é realizado com a utilização de ramos-semente. Este método acarreta um aumento na incidência de infecções virais durante esta reprodução contínua e conduz à queda na produção e qualidade da cultura (Kroth *et al.*, 2004). Dentre os patógenos que podem acometer a cultura, os vírus merecem destaque devido a capacidade de formar complexos virais ou infecções mistas, onde as espécies envolvidas podem atuar em sinergismo potencializando a doença (Untiveros *et al.*, 2007).

O gênero viral com o maior número de espécies relatadas infectando batata-doce é *Begomovirus*. As espécies deste gênero são constituídas de genoma na forma de DNA circular de fita simples podendo ser monopartido ou bipartido e são transmitidas às plantas na natureza pelo vetor mosca-branca (*Bemisia tabaci*) por meio da relação do tipo circulativa não propagativa (Rubinstein & Czosnek, 1997).

No Brasil, as espécies virais amplamente distribuídas em batata-doce são: *Sweet potato feathery mottle virus* – SPFMV (gênero *Potyvirus*) (Kroth *et al.*, 2001) e *Sweet potato leaf curl virus* – SPLCV (gênero *Begomovirus*) (Albuquerque *et al.*, 2012).

Algumas espécies virais já relatadas em batata-doce em outros países ainda não foram relatadas no Brasil. A exemplo disso temos 11 espécies aceitas pelo ICTV (International Committee on Taxonomy of Viruses) para o gênero *Begomovirus* (família *Geminiviridae*), e que encontram-se listadas a seguir: *Sweet potato leaf curl Canary virus* – SPLCCV, *Sweet potato leaf curl China virus* – SPLCCNV, *Sweet potato leaf curl Georgia virus* – SPLCGV, *Sweet potato leaf curl South Carolina virus* – SPLCSCV, *Sweet potato leaf curl Uganda virus* – SPLCUV, *Sweet potato leaf curl Henan virus* – SPLCHnV, *Sweet potato leaf curl Sichuan virus 1* – SPLCSiV-1, *Sweet potato leaf curl Sichuan virus 2* – SPLCSiV-2 e *Sweet potato mosaic virus* – SPMV; duas espécies aceitas no gênero *Potyvirus* (família *Potyviridae*): *Sweet potato virus 2* – SPV2 e *Sweet potato virus C* – SPVC; uma espécie do gênero *Solendovirus* (família *Caulimoviridae*): *Sweet potato vein clearing virus* – SPVVCV; uma espécie do gênero *Badnavirus* (família *Caulimoviridae*): *Sweet potato vein clearing virus* – SPVVCV (Cuellar *et al.*, 2011); uma espécie do gênero *Carlavirus*, família *Betaflexiviridae*: *Sweet potato C6 virus* – SPC6V (Loebenstein *et al.*, 2009) e uma espécie da família *Luteoviridae* (ainda sem gênero designado): *Sweet potato leaf speckling virus* – SPLSV (Fuentes *et al.*, 1996).

A diagnose viral em batata-doce é dificultada pela complexa manifestação de sintomas, estágio de desenvolvimento da planta, condições ambientais e pela ocorrência de infecções

mistas (Fernandes & Dusi, 2013). O advento de novas tecnologias aliadas ao sequenciamento em larga escala tem permitindo avanços no estudo, caracterização e diagnose de vírus. Tecnologias de *Next Generation Sequencing* – (NGS) têm aumentado a capacidade de produzir *reads* (leituras) a partir de uma amostra de ácido nucleico resultando em um aumento exponencial de patógenos caracterizadas nos últimos anos (Barzon *et al.*, 2011).

A metagenômica foi assim denominada devido não depender do conhecimento prévio do genoma viral e tem sido amplamente utilizada em várias áreas da Ciência, promovendo a descoberta e identificação de novas espécies que em sua maioria tem se mostrado inéditas as espécies previamente descritas (Mokili *et al.*, 2012, Simmonds *et al.*, 2017).

Essa nova abordagem para detecção de vírus em batata-doce foi primeiramente utilizada por Kreuze *et al.* (2009) onde relataram a identificação de novas espécies pela realização do sequenciamento de alto rendimento (*Illumina* / *Solexa*) a partir de pequenos RNAs (small RNAs), por meio do qual foi possível detectar o genoma parcial da espécie tentativa Sweet potato symptomless mastrevirus 1-SPSMV-1.

Recentemente, Cao *et al.* (2017) também realizaram sequenciamento de siRNAs, por *Illumina* HiSeq, de batata-doce e com os *reads* gerados foi possível montar *contigs* referentes ao genoma completo de SPSMV-1. Neste trabalho as sequências completas de nove isolados SPSMV-1 provenientes de diferentes países: Quênia, Coréia, China, Taiwan, via CIP (Peru), Estados Unidos e Uruguai) foram obtidas e apresentaram um diferente nonanucleotídeo (TAAGATTCC) e uma ORF (*Open Reading Frame*) C3.

O objetivo deste trabalho foi realizar um levantamento de espécies virais que infectam batata-doce obtidas de nove estados do Brasil (regiões Norte, Nordeste, Centro-Oeste, Sudeste e Sul), num total de 100 amostras, sendo uma amostra oriunda da Argentina.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Origem das amostras utilizadas

Para a análise do viroma, um total de **100** cultivares da batata-doce foram obtidos. Destes, **30** cultivares foram coletados em 14 Regiões Produtoras de Pernambuco (RPP), **12** cultivares provenientes de regiões produtoras de dois estados do País: Rio Grande do Norte (10 cultivares) e Paraíba (2 cultivares) e **58** de Banco Ativo de Germoplasma (BAG), sendo 27 deles provenientes do Banco Ativo de Germoplasma da Universidade Federal Rural de Pernambuco - UFRPE (BAG-UFRPE), cinco do Banco Ativo de Germoplasma do Instituto Agrônômico de Pernambuco e 26 do Banco Ativo de Germoplasma da Fazenda Água Limpa (BAG-FAL).

Os 26 cultivares do BAG-FAL-UnB representam materiais coletados em seis estados brasileiros a saber: Minas Gerais (2), Amazonas (1), Distrito Federal (10), Rio Grande do Sul (2), Mato Grosso do Sul (1) e Santa Catarina (1), localidade não definida (8) e um acesso da Argentina (**Tabela 1**).

Tabela 1. Lista de variedades de batata-doce (*Ipomoea batatas*) utilizadas no presente trabalho e respectivos locais de coleta

Nº	Cultivar	Local de coleta
1	Batateira	Itapissuma – PE
2	Batateira	Goiana – PE
3	Vitória	Nazaré da Mata – PE
4	Ligeirinha	Pedra de Fogo – PB
5	Batata Roxa	Paudalho – PE
6	Princesa	Paudalho – PE
7	Granfina	Itambé – PE
8	Parece	Itambé – PE
9	Paulistinha	Itambé – PE
10	Muciliana	Itambé – PE
11	Granfina do Talo Roxo	Goiana – PE
12	Acesso nº 1202	
13	Acesso nº 1219	
14	Acesso nº 1007	Itambé IPA ¹ – PE
15	Acesso nº 1189	
16	Acesso nº 1213	
17	CO Roxa	São Joaquim do Monte – PE

18	Pé de Pombo	
19	Branquinha	
20	Branquinha	
21	Branquinha	Belém de Maria – PE
22	Pé de Pombo	Belém de Maria – PE
23	Pé de Pombo	
24	Branca	Camocim de São Félix – PE
25	Orelha de Burro	
26	Angico	
27	Agrestina	
28	Balão Roxo	
29	Branca do Talo Roxo	
30	Branca de Altinho	
31	Bom Nome	
32	Carpinteira	
33	Centenial	
34	CR-06	
35	Coroatã	
36	Eucalipto	
37	Granfina	
38	Grossa da Paz	
39	L7-Bege	BAG/UFRPE - PE ²
40	Mãe de família	
41	Mineira	
42	Olho de Urubu	
43	Pérola	
44	Pedra-02	
45	Pincel	
46	Rabo de Boi	
47	RC-03	
48	Talo Roxo	
49	UFRPE-1.88	
50	Var. J.G.Pierre	
51	Vitorinha	
52	010-CNPH	
53	1RN	
54	2RN	
55	4RN	
56	6RN	
57	7RN	Rio Grande do Norte
58	8RN	
59	9RN	
60	10RN	

61	11RN	
62	12RN	
63	Princesa	Brazlândia – DF
64	Roxinha	
65	Brazlândia Rosada	
66	Braz Rosada	Brasília – DF
67	Santa Sofia	
68	29	
69	Georgia Improved	Viçosa – MG
70	41	Brasília – DF
71	Balão	Manaus – AM
72	53	Brasília – DF
73	Rainha	Pompeu – MG
74	Batata Africana	Argentina
75	Batata Correntina n° 24	Brasília – DF
76	69	
77	71	Não Me Toques – RS
78	80	Cangussu – RS
79	87	Campo Grande – MS
80	1796	Palmeira – SC
81	Araçá	Paudalho – PE
82	Campo 1	Camaragibe – PE
83	Campo 1	Vitória – PE
84	Campo 1	Itamaracá – PE
85	Campo 1	Igarassu – PE
86	Amélia	
87	BRS Cuia	
88	Beauregard	
89	Canadense	
90	Coquinho	FAL/UnB-DF ³
91	Rosada Prudente	
92	Rubissol	
93	Uruguaiana	
94	Planta 1	Bonito – PE
95	Campo 1	Camaragibe – PE
96	Campo 1	Abreu e Lima – PE
97	Campo 1	Itapissuma – PE
98	Campo 1	Igarassu – PE
99	Campo 1	Mamanguape – PB
100	Cambrainha	Igarassu – PE

¹ IPA: Instituto Agrônomo de Pernambuco

² BAG/UFRPE: Banco Ativo de Germoplasma da Universidade Federal Rural de Pernambuco

³ FAL/UnB: Fazenda Água Limpa da Universidade de Brasília

2.2 Manutenção das plantas utilizadas

Para esse estudo, as cultivares de batata-doce foram estabelecidas e mantidas em vasos com solo autoclavado, sendo três vasos para cada planta em casa de vegetação da Estação Experimental de Biologia da UnB (EEB-UnB). As análises foram realizadas no Laboratório de Virologia Vegetal do Departamento de Fitopatologia da Universidade de Brasília - UnB (LVV-Fito UnB).

2.3 Detecção viral utilizando métodos sorológicos

2.3.1 Detecção de *Sweet potato mild mottle virus* (SPMMV) e *Sweet potato feathery mottle virus* (SPFMV) por *Dot-Enzyme Linked Immunosorbent Assay* – **Dot-ELISA**

A detecção de *Sweet potato mild mottle virus* (SPMMV) e *Sweet potato feathery mottle virus* (SPFMV) foi realizada, inicialmente, por teste sorológico Dot-ELISA (*Dot-Enzyme Linked Immunosorbent Assay*; em membrana de nitrocelulose Hybond C - GE Healthcare), extraído-se o extrato vegetal a partir de cada repetição de 100 amostras de plantas de batata doce. Um disco foliar foi retirado de folhas sintomáticas da terceira posição do ápice para baixo. Este foi macerado em nitrogênio líquido dentro de um tubo de microcentrífuga, e adicionado 1 mL da solução tampão PBS-1X, com 0,1 % de sulfito de sódio, obtendo-se o extrato bruto. Cada amostra foi diluída para proporção de 1:10 p/v (Pio-Ribeiro *et al.*, 1994). Aplicou-se na membrana 2 µL de ambas as amostras (extrato bruto e extrato diluído). Com a membrana seca aplicou-se a solução de bloqueio PBS-Tween 2 % (PBS-T) + 5 % p/v de leite desnatado. Após a incubação à temperatura ambiente por uma hora sob agitação, a membrana foi lavada três vezes com 10 mL de PBS-T, 10 min por vez. Em seguida adicionou-se o anticorpo policlonal para SPMMV na proporção de 1:1.000 e incubou-se a temperatura ambiente por duas horas sob agitação. A membrana foi novamente lavada com PBS-T por três vezes de 5 minutos sob agitação. Adicionou-se o anticorpo secundário (goat-anti-rabbit-Invitrogen) na diluição 1:30.000, (µl:ml) seguindo-se incubação a temperatura ambiente por três horas em agitação.

Após novas lavagens de 15 minutos cada em agitação, adicionou-se 10 mL do Tampão de Revelação (Tris-HCl 100 mM, NaCl 100 mM, MgCl₂ 5 mM) e nesta adicionou-se 33 µL de BCIP (5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato) e 66 µL de NBT (Cloreto Nitroazul de Tetrazólio). As membranas na solução ficaram sob agitação até que se observasse a formação de manchas púrpuras no local de deposição das amostras, indicando a presença viral. A reação de revelação foi interrompida através de lavagens da membrana com água destilada.

Os antissoros foram obtidos da Universidade Federal Rural de Pernambuco, cedidos pelo professor Gilvan Pio Ribeiro e os controles positivos para os respectivos vírus foram obtidos do Centro Internacional de Batata (CIP) pelo pesquisador da Embrapa Hortaliças, Dr. Alexandre Mello e gentilmente cedidos para serem utilizados neste trabalho.

2.4 Detecção viral por meio de análise metagenômica

2.4.1 Enxertia de *Ipomoea batatas* em *Ipomoea setosa*

Para *Next Generation Sequencing* (NGS), folhas sintomáticas de 100 cultivares de batata-doce foram usadas sendo 58 plantas provenientes de diferentes BAGs e 42 plantas de regiões produtoras (**Tabela 1**). Estas folhas foram coletadas a partir das ramas mantidas na casa de vegetação.

Para a realização da enxertia, plantas de *I. setosa* foram obtidas a partir de sementes oriundas da Universidade Federal Rural de Pernambuco, cedidas pelo professor Gilvan Pio Ribeiro. Aos 40 dias após a semeadura as plantas foram preparadas para serem enxertadas método de garfagem cortando-se as folhas laterais. Como enxerto foi utilizada a parte apical das ramas (5 cm) de batata-doce, cortadas em bisel, que foram presas com parafilme

A inoculação por enxertia foi realizada utilizando ramas de todas as plantas de *I. batatas*, algumas exibindo sintomas de desvios de cor (clareamento das nervuras, clorose internerval e bronzeamento) e deformações foliares (**Figura 1**), folhas de *I. batatas*, de cada planta enxertada, foram armazenadas em freezer -80 °C para análises posteriores.

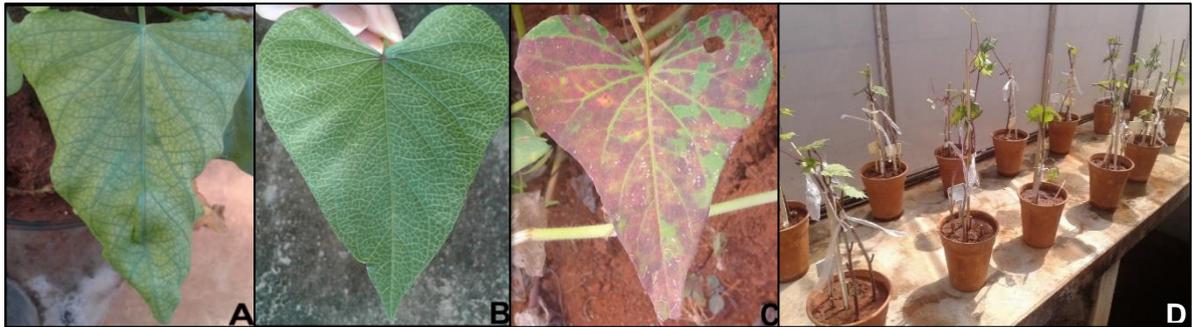


Figura 1. Folhas de plantas de batata-doce (*Ipomoea batatas*) exibindo sintomas típicos de infecção por vírus. **A** - Folha da cv. Princesa - Paudalho / Pernambuco (PE) com clorose internerval; **B** - Folha da cv. Acesso 1219 - IPA (Instituto Agrônomo de Pernambuco) / PE, com clorose nas nervuras; **C** - Folha da cv. Ligeirinha - Pedra de Fogo / Paraíba, apresentando sintomas de bronzeamento; **D** - Plantas de batata-doce enxertadas em *Ipomoea setosa* (Fotos: Caroline Souza).

2.4.2 Semipurificação de partículas virais – Enriquecimento para vírus de RNA

Para realizar a semipurificação, após 60 dias da enxertia de *I. batatas* em *I. setosa*, foram coletadas folhas de *I. setosa* com a finalidade de concentrar partículas virais presentes nos 100 cultivares de plantas de batata-doce, possivelmente, transferidos para *I. setosa* por enxertia. O mesmo procedimento foi realizado, diretamente, a partir das folhas de batata-doce a fim de comparar as espécies virais encontradas nas diferentes plantas, uma vez que a *I. setosa* é amplamente utilizada como planta indicadora para vírus de batata-doce. As plantas enxertadas apresentaram sintomas de clareamento das nervuras e pontos cloróticos em sua maioria. As amostras para a semipurificação, foram pesadas individualmente 1 g de cada planta, e depois agrupadas, em *pool*, formando uma amostra composta com 10 plantas (10 g). Em seguida o *pool* de amostra foi macerado em nitrogênio líquido. Adicionou-se 100 mL de tampão fosfato de sódio 0,1 M, EDTA 1 mM e 200 µL β-mercaptoetanol (adicionado na hora). Filtrou-se o macerado com gaze previamente autoclavado e transferiu-se o filtrado para um tubo fálcon. Os tubos foram centrifugados a 5.000 rpm por 20 minutos, a 4 °C (centrífuga preparativa – Thermo Scientific). Ao fim da centrifugação, transferiu-se o sobrenadante para tubos de ultracentrífuga (Beckman – rotor Ti45). Nestes, foram adicionados 20 mL de solução de sacarose a 20 % no

fundo do tubo, para formação de um colchão de sacarose. Centrifugou-se então a 33.000 rpm, por 2 horas, a 4 °C, a vácuo. O sobrenadante foi descartado e o pélete lavado e homogeneizado com 500 µL de tampão fosfato 0,1 M (**Figura 2**).

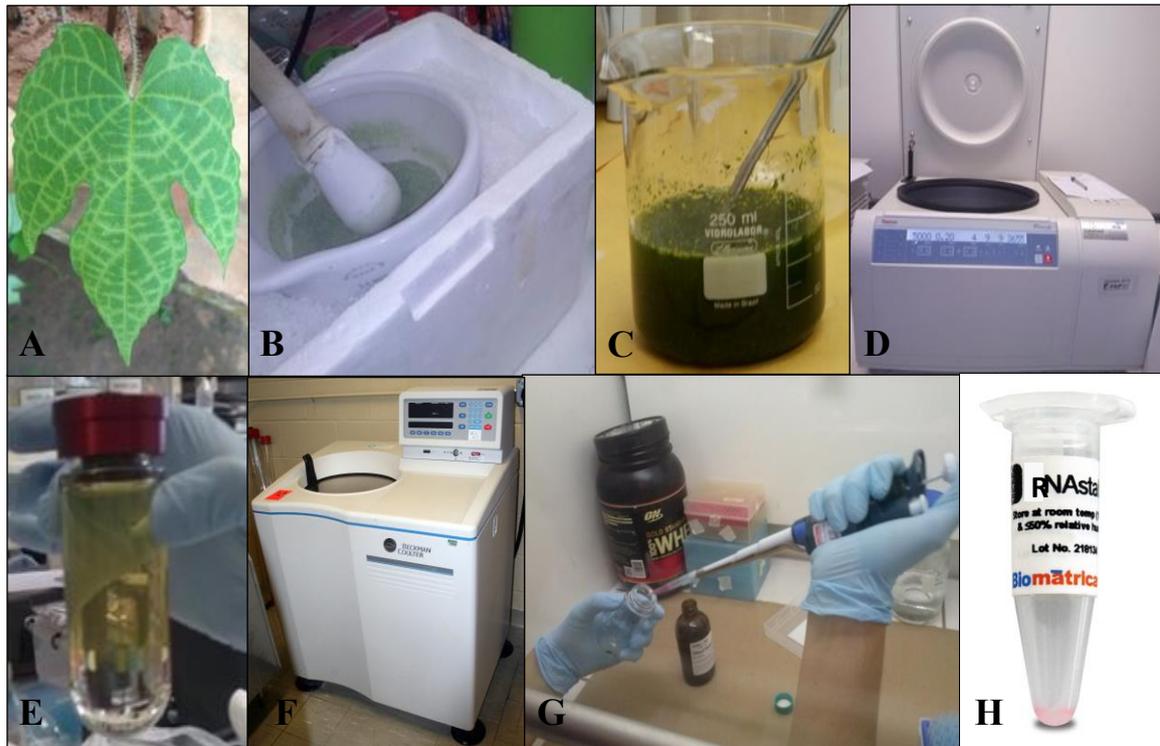


Figura 2 - Esquema da preparação das amostras para sequenciamento. **A** - Folha de *Ipomoea setosa* com sintoma de clareamento das nervuras, **B** - Maceração de folhas em nitrogênio líquido, **C** - Folhas maceradas com solução de tampão fosfato de sódio, **D** - Centrifuga preparativa - *Thermo Scientific*, **E** - Tubo de ultracentrifuga com a amostra e colchão de sacarose no fundo, **F** - Ultracentrifuga Beckman Coulter, **G** - Homogeneização do pélete, **H** - Tubo RNASTable - Biomátrica. (Fotos: Michele Pantoja e Caroline Souza)

2.4.3 Extração de ácidos nucleicos (em pool para *Next Generation Sequencing*)

Para análise do ácido nucleico foi realizada extração utilizando-se o método Trizol segundo instruções do fabricante, a partir do pélete homogeneizado, conforme mencionado anteriormente, transferindo-se com pipeta, para um tubo de microcentrifuga (1,5 mL) e adicionou-se 1 mL de Trizol. Adicionou-se 200 µL de clorofórmio em cada tubo e agitou-se vigorosamente por 15 segundos (manualmente). A mistura foi incubada por 3 minutos em

temperatura ambiente e em seguida centrifugada a 12.000 g, por 15 minutos, a 4 °C. Após este processo foi possível separar os ácidos nucleicos, coletando a fase aquosa, onde se encontra o RNA e interfase e fase orgânica onde está o DNA. Depois da separação para isolar o RNA, transferiu-se o sobrenadante para um novo tubo (fase aquosa). Adicionou-se 500 µL de isopropanol gelado e homogeneizou-se invertendo, gentilmente, os tubos. As amostras foram incubadas por 10 minutos e em seguida centrifugadas a 12.000 g, por 10 minutos, a 4 °C. Descartou-se o sobrenadante e adicionou-se 1 mL de etanol 75% (preparado com água DEPC-Diethyl Pyrocarbonate). Centrifugou-se a 7.500 g, por 5 minutos, a 4°C e descartou-se o sobrenadante. Após as amostras estarem secas, o pélete foi ressuspensionado em 50 µL de água milliQ tratada com DEPC (Diethylpyrocarbonate). Paralelamente foi realizado o isolamento do DNA onde, após ter retirado toda a fase aquosa, adicionou-se, à interfase e fase orgânica, 300 µL de etanol 100 % e homogeneizou-se invertendo os tubos várias vezes. Incubou-se por 3 minutos em temperatura ambiente seguido de centrifugação a 2.000 g, por 5 minutos a 4 °C. Descartou-se o sobrenadante e adicionou-se 1mL de citrato de sódio/etanol 0,1 M. Incubou-se por 30 minutos em temperatura ambiente, invertendo ocasionalmente. Centrifugou-se a 2.000 g por 5 minutos a 4 °C. Adicionou-se 2 mL de etanol 75 % e incubou-se por 15 minutos em temperatura ambiente, invertendo ocasionalmente. Passado o tempo, as amostras foram centrifugadas a 2.000 g, por 5 minutos, a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e quando os péletes estavam secos, foram ressuspensionados em 50 µL água Milli-Q tratada com DEPC, após essa etapa as amostras foram quantificadas em espectrofotômetro Nanovue, e foi realizada eletroforese em gel de agarose a 1 % e para visualização de bandas em transiluminador – UV (L-Pix). Em seguida, as amostras foram armazenadas em RNASTable (meio de armazenamento que preserva amostras de RNA em temperatura ambiente), até serem enviadas para sequenciamento, a plataforma utilizada foi *Illumina Hiseq* e o sequenciamento foi realizado na Macrogen (Coréia do Sul).

2.4.4 Sequenciamento de alto desempenho – Triagem, montagem e análise dos contigs

O sequenciamento de alto desempenho gerou *reads* (leituras) que foram submetidos a triagem pelo programa CLC Genomics Workbench (versão 8.0), com intuito de deixar as sequências em boa resolução. Os *contigs* montados foram submetidos à análise do programa *Blastn* e *Blastx* contra o banco de dados viral RefSeq (GenBank), o qual foi criado com base em sequências genômicas de vírus do GenBank e os *contigs* que obtiveram *hits* com vírus de plantas foram selecionados e analisados com auxílio do programa *Geneious* (version 10) (Kearse *et al.*, 2012).

2.4.5 Extração de RNA total de amostras individuais de *Ipomoea batatas* e *Ipomoea setosa*

Para a realização da extração do RNA total, as 100 plantas de batata-doce e as 100 plantas de *I. setosa* enxertadas, foram amostradas individualmente e agrupadas formando amostras compostas por oito discos foliares, maceradas em nitrogênio líquido e imediatamente foi adicionado 350 µL de HEPES 0,03 M (C₈H₁₈N₂O₄S). Para cada amostra foi adicionado 300 µL de fenol pH 8,0 e 300 µL de tampão de extração (LiCl 0,1 M, Tris base 0,1 M, EDTA 0,01 M, SDS a 1 %) aquecido a 80 °C. Agitou-se por 30 segundos em vórtex e centrifugou-se a 13.000 rpm por 5 minutos. Uma alíquota de 600 µL do sobrenadante foi retirada e transferida para novo tubo. Adicionou-se 600 µL de clorofil (clorofórmio: álcool-isoamílico na proporção de 24:1). Agitou-se, manualmente, por 2 minutos e centrifugou-se a 13.000 rpm por 7 minutos a 4 °C. O sobrenadante (550 µL) foi transferido para novo tubo. Adicionou-se 550 µL de cloreto de lítio (LiCl) a 4 M, para que fosse incubado a 4 °C *overnight*. No dia seguinte os microtubos foram centrifugados a 13.000 rpm por 20 minutos a 4 °C. Descartou-se o sobrenadante e deixou secar em temperatura ambiente. Para degradação de proteína foram adicionados 200 µL de Proteinase K-buffer (NaCl 0,3 M, Tris-HCl 0,2 M, EDTA 0,025 M, SDS a 2 %) e 20 µL de Proteinase K (20 mg/mL). As amostras foram incubadas a 37 °C por 30 minutos. Após esse

tempo, adicionou-se 420 µL de fenol e agitou-se manualmente. Centrifugou-se a 13.000 rpm por 7 minutos a 4°C e 380 µL do sobrenadante foi transferido para novo tubo. Adicionou-se 380 µL de clorofórmio puro, agitou-se manualmente. Centrifugou-se a 13.000 rpm por 7 minutos a 4°C e 350 µL do sobrenadante foi transferido para novo tubo. Para precipitação adicionou-se 35 µL que equivale a 0,1 volume de acetato de sódio 3M (NaAc) e 2,5 volume de etanol absoluto 100 % (EtOH). As amostras foram levadas ao freezer -20 °C por 20 minutos e centrifugou-se a 13.000 rpm por 15 minutos a 4°C. Descartou-se o sobrenadante e adicionou-se 500 µL de etanol 70 % (EtOH). Centrifugou-se a 13.000 rpm por 5 minutos a 4°C e descartou-se o sobrenadante. Com as amostras completamente secas, ressuspendeu-se o pélete com 30 µL de Tris-EDTA (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM - pH 8,0) e armazenou-se a -80°C (Verwoerd, 1989).

2.4.6 Extração de DNA total de amostras individuais de *Ipomoea batatas* e *Ipomoea setosa*

Para a extração de DNA total foram usadas amostras de 100 plantas de batata-doce (**Tabela 1**) e 100 amostras coletadas de plantas de *I. setosa* enxertadas, visando estudos posteriores de detecção de vírus obtidos via NGS e reações de PCR utilizando *primers* específicos para espécies do gênero *Begomovirus*. Para extração do DNA total coletaram-se 3 discos foliares da segunda folha de cada planta e utilizou-se o protocolo CTAB (Cetyltrimethylammonium bromide) (Boiteux *et al.*, 1999). O material vegetal foi macerado em microtubos com capacidade de 1,5 mL em presença de 600 µL de tampão de extração (Tris-HCl 0,1 M, EDTA 0,1 M, NaCl 1,4 M, Sulfito 0,01 M e 2 % de CTAB), posteriormente os tubos foram levados ao banho-maria a 65°C por 10 minutos. Posteriormente, foi adicionado às amostras 600 µL de clorofil (clorofórmio e álcool isoamílico na proporção de 24:1), seguindo-se com agitação vigorosa em *vórtex* por 30 segundos. As amostras foram centrifugadas a 13.200 rpm por 5 minutos, após este processo, retirou-se 450 µL do sobrenadante, transferindo-se para outro tubo

novo, ao qual adicionou-se também 300 μL de isopropanol. Em seguida o tubo foi invertido lentamente para homogeneizar o material e as amostras foram levadas ao *freezer* por 10 minutos para precipitação. Após esse período, as amostras foram submetidas à centrifugação a 13.200 rpm por 13 minutos. O sobrenadante foi descartado e o pélete lavado com 50 μL de álcool 70% seguido de centrifugação a 13.200 rpm por 5 minutos. O pélete foi seco à temperatura ambiente e ressuspendido em 50 μL de água Milli-Q. A qualidade do DNA extraído foi verificada através de eletroforese em gel de agarose à 1 % em tampão Tris-Borato-EDTA (TBE) (Tris-HCl 0,1 M, ácido bórico, 0,1 M e EDTA 0,02 mM) sob corrente de 80 V/cm, onde foi pipetada a mistura constituída por 2 μL de cada amostra e 2 μL de tampão de carregamento (0,25 % de azul de bromofenol e 40 % de sacarose -p/v, 0,25 % de xileno cianol). O gel foi corado com brometo etídio (10 mg/mL) e os fragmentos de DNA visualizados em transiluminador UV (Loccus Biotecnologia). Todas as amostras de DNA total extraídas, foram mantidas a -20°C e a quantificação da concentração foi realizada no espectrofotômetro Nanovue (GE Healthcare).

2.4.7 Amplificação por círculo rolante (*Rolling Circle Amplification* - RCA) – Enriquecimento para vírus de DNA circular

Para amplificação por círculo rolante e após a confirmação da qualidade do DNA, foi preparada uma reação com 10 μL de volume final, contendo: 0,1 μL de *Phi-29* DNA polimerase (10.000 U/mL), 1 μL de BSA (10X), 1 μL de dNTPs (2,5 mM), 1 μL de *primer* Tioprotégido (50 μM), 4,9 μL de água Milli-Q e 1 μL de DNA extraído (20 ng/ μL). A reação foi incubada a 30°C por 18 horas e a 65°C por 10 minutos para inativar a enzima (Inoue-Nagata *et al.*, 2004). A verificação dos resultados foi feita pipetando-se 1 μL da reação de RCA de cada amostra com 2 μL de tampão de carregamento em gel de agarose a 1 %. A eletroforese foi realizada em tampão TBE sob corrente de 80 V/cm. O gel foi corado com brometo etídio (10 mg/mL) e os fragmentos de DNA visualizados em transiluminador UV (Loccus Biotecnologia).

2.4.8 Desenho de *primers* para detecção de espécies virais

Para a detecção das espécies virais, previamente detectadas por NGS, nas plantas de batata-doce originais, foram selecionadas inicialmente 22 amostras (dentro das 100 cultivares) representando todas as regiões do Brasil (**Tabela 2, Figura 3**). Foram desenhados *primers* específicos com base nas sequências obtidas do sequenciamento *Illumina*, utilizando o programa *Geneious* (v.10) (**Tabela 3**). Estes oligonucleotídeos e os demais (*Sweet potato mild mottle virus* - SPMMV/*Ipomovirus*, *Sweet potato leaf curl virus* – SPLCV/*Begomovirus*, *Sweet potato caulimo-like virus* - SPCLV e *Sweet potato vein clearing virus* – SPVCV/*Cavemovirus*), obtidos de outros trabalhos citados na **Tabela 4**, foram utilizados para detectar as respectivas espécies virais nas amostras de batata-doce.

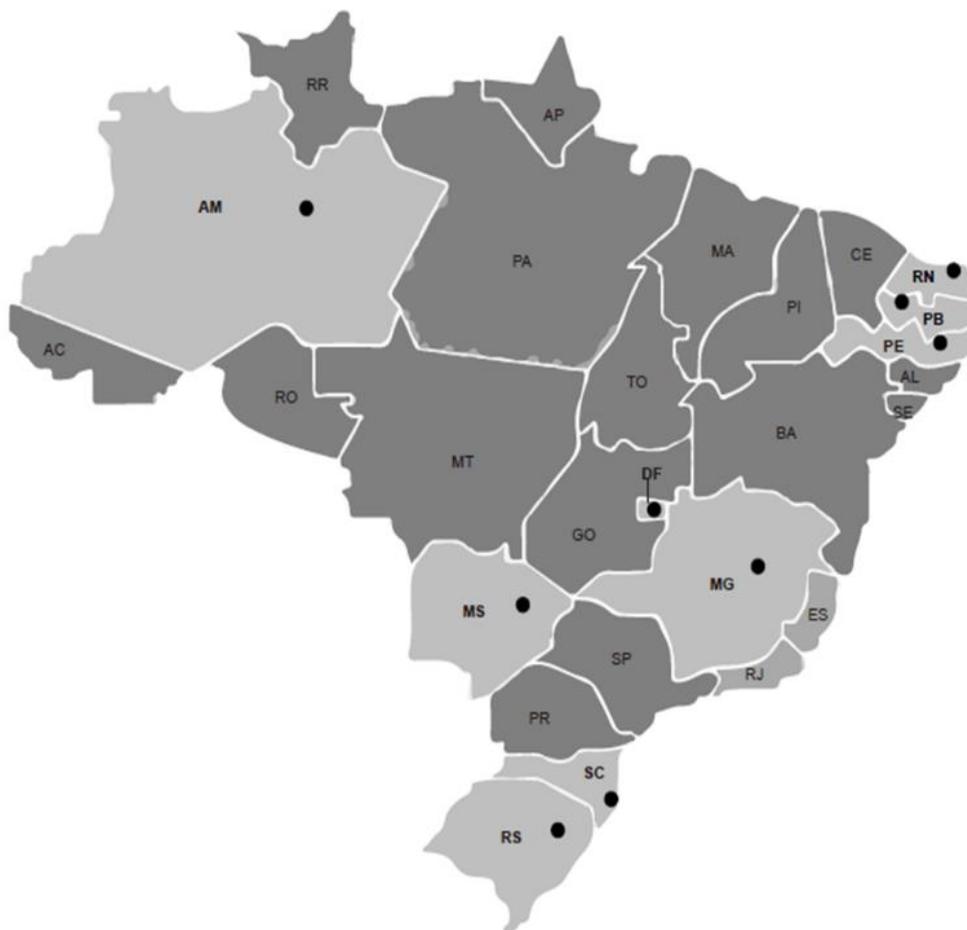


Figura 3. Pontos de coleta das amostras de batata-doce (*Ipomoea batatas*) por estado.

Tabela 2. Cultivares de batata-doce (*Ipomoea batatas*) selecionadas para realização de testes de detecção viral e os respectivos locais de coleta

Número	Planta	Local
1	Vitória	Nazaré da Mata – PE
2	Ligeirinha	Pedra de Fogo – PB
3	Princesa	Paudalho – PE
4	Paulistinha	Itambé – PE
5	Acesso nº 1202	Coleção da Estação de Itambé IPA – PE
6	Branquinha	São Joaquim do Monte – PE
7	Branquinha	Belém de Maria – PE
8	Pé de Pombo	Camocim de São Félix – PE
9	CR-06	
10	Mãe de Família	BAG/UFRPE, PE ¹
11	Olho de Urubu	
12	Pérola	
13	2RN	Rio Grande do Norte
14	Roxinha	Brazlândia – DF
15	Balão	Manaus – AM
16	Rainha	Pompeu – MG
17	71RS	Não Me Toque - RS
18	87MS	Campo Grande - MS
19	1796SC	Palmeira – SC
20	Planta 1	Vitória – PE
21	Amélia	FAL/UnB-DF ²
22	Beauregard	FAL/UnB-DF

¹BAG- UFRPE: Banco Ativo de Germoplasma/Universidade Federal Rural de Pernambuco

²FAL/UnB: Fazenda Água Limpa/Universidade de Brasília

Tabela 3. Primers desenhados com base nas sequências obtidas pelo sequenciamento *Illumina* para detecção das espécies de vírus identificadas por *Next Generation Sequencing* - NGS em batata-doce (*Ipomoea batatas*)

Gênero	Espécie	Nome/Posição ¹	Sequência 5' - 3'	Ta ^{o/2}	Amplicon	Região do genoma
<i>Begomovirus</i>	<i>Sweet potato mosaic virus</i> (SPMV)	SPMV_190F	TACGAGCCAGGAACCCTAGG	58	1.031 pb	CP
		SPMV_1.221R	ACGCGTCTGACTGGTGTTATT			
	<i>Sweet potato golden vein associated virus</i> (SPGVaV)	SPGVaV_254F	CCTTAGGGTTCGAGCTCTGT	58	1.038 pb	CP
		SPGVaV_1.292R	GACCCGTCTAACTGGTGCTA			
<i>Potyvirus</i>	<i>Sweet potato feathery mottle virus</i> (SPFMV)	SPFMV_4.177F	TGGCATGGAAAATGTGCACA	59	233 pb	P3
		SPFMV_4.410R	TGCAGCTAGTGATGTTCGCA			
	<i>Sweet potato virus C</i> (SPVC)	SPVC_1.654F	GACGCCTTCTATGAAGCGGA	60	408 pb	P1(PISPO/3)
		SPVC_2.061R	GCTAAAGCCCCACGAACCA			
	<i>Sweet potato virus G</i> (SPVG)	SPVG_10.312F	CATACATGCCGAGGTATGGTCT	59	317 pb	CP
		SPVG_10.629R	ACACTGAAGGCGAAACTGAA			
<i>Crinivirus</i>	<i>Sweet potato chlorotic stunt virus</i> (SPCSV)	RNA2_4.359F	ATGGCCGATAGTAACAAAACAG	54	773 pb	CP
		RNA2_5.132R	CGATCACGAACCAAAAAGGC			

¹ Nome do *primer* e posição na sequência do genoma do vírus

² Ta: Temperatura de anelamento do *primer*.

*PISPO: Pretty Interesting Sweet Potato Potyvirus ORF

Tabela 4. Primers obtidos da literatura para detecção das espécies de vírus obtidas por *Next Generation Sequencing*- NGS neste trabalho em cultivares de batata-doce (*Ipomoea batatas*)

Espécie/Gênero	Nome primer	Sequência 5' - 3'	Ta ^{o/1}	Fragmento (pb)	Região do genoma	Referência
<i>Sweet potato mild mottle virus</i> (SPMMV)/ <i>Ipomovirus</i>	MPIpF	GGBAAYAAAYAGYGGDCARCC	56	1.400	NIB ²	Rukarwa <i>et al.</i> , 2010
	MPIpR	TTGAGCTCCTCTCAGACT				
<i>Sweet potato leaf curl virus</i> (SPLCV)/ <i>Begomovirus</i>	MA292	CCYTAGGGTTCGAGCTVTGTTCCGG	48	823	CP ³	Lozano <i>et al.</i> , 2009
	MA293	TTTATTAATTDTRTGCGAATC				
Sweet potato symptomless mastrevirus 1 (SPSMV-1)/ <i>Mastrevirus</i>	SPSMV1_F	CCTAAGTCGTCGTCCGATAG	64	417	MP ⁴ /CP	Cao <i>et al.</i> , 2017
	SPSMV1_R	TTGAGTCCAGGTAAACTGAGC				
<i>Sweet potato vein clearing virus</i> (SPVCV)/ <i>Cavemovirus</i>	cavV_F	TGAATGCAAAGACAAAAACCTA	55	373	RT ⁵ domain	Cuellar <i>et al.</i> 2011
	cavV_R	GATAAACTAACTCCTGCTTCTT				
<i>Sweet potato caulimo-like virus</i> (SPCV)/ <i>Cavemovirus</i>	cav_F	AGGAAATCCCAGTATTATTCAAC	55	927	RT ⁵ domain	De Souza & Cuellar, 2011
	cav_R	ATTTCTAATTTGGTTTACTAATCC				

¹ Ta: Temperatura de anelamento

² NIB: Nuclear Inclusion body

³ CP: Coat protein

⁴ MP: Movement protein

⁵ RT: Reverse Transcriptase

2.4.9 RT-PCR (*Reverse Transcriptase - Polymerase Chain Reaction*)

A reação de transcrição reversa foi realizada utilizando 4,5 µL de RNA total (30 ng/µL), 0,5 µL de dNTP (10 mM) e 1 µL do *primer* randômico (10 µM) (Promega), seguida de 5 minutos de incubação à temperatura de 70 °C para desnaturação da fita de RNA e 2 minutos no gelo para que as fitas permanecessem separadas. Posteriormente foram adicionados 2 µL de MMLV-RT Buffer 5X (Invitrogen), 1 µL de DTT (0,1 M), 0,5 µL da enzima MMLV-RT (200 U/µL) e 0,5 µL de RNaseout totalizando 10 µL de reação. A temperatura de incubação utilizada nesta etapa foi de 25 °C por 10 minutos, 37 °C, por 1 hora em termociclador (Bio-Rad T-100 Thermal Cycler) seguida por um período de incubação de 65 °C por 15 minutos para a inativação da enzima.

A PCR, a partir do DNA complementar (cDNA) produzido nesta etapa, foi realizada nas seguintes condições: reação para 25 µL de volume final contendo 2,5 µL de Tampão 10 X da enzima *Taq* Polymerase (100 mM Tris-HCl, pH 8,3 e 500 mM KCl, Invitrogen), 0,75 µL de MgCl₂ (50 mM, Invitrogen), 0,25 µL dNTPs (2,5 mM, Invitrogen), 0,5 µL de cada *primer* (10 µM), 0,1 µL da enzima *Taq* Polimerase (5 U/µL, Invitrogen), 19,9 de água MiliQ e 1 µL do cDNA como molde para a PCR. As condições de incubação foram: desnaturação inicial a 94°C por 2 min, seguida de 35 ciclos a 94°C por 30 segundos (desnaturação), 54 a 62°C por 1 min (anelamento) (variação de acordo com os *primers* das **Tabelas 3 e 4**) e 72°C por 1 min (extensão). Após os 35 ciclos procedeu-se uma extensão final a 72 °C por 10 minutos, em seguida uma alíquota de 5 µL da reação foi misturada a 2 µL de tampão de carregamento em gel de agarose 1 % em tampão TBE. Os fragmentos foram separados por eletroforese a 80 V/cm e observados em transiluminador – UV (L-Pix).

2.4.10 Purificação

Para realizar a purificação dos fragmentos de DNA para o sequenciamento Sanger foi necessário aumentar o volume de DNA para 100 µL, realizando-se PCR conforme mencionado anteriormente e utilizando-se o kit de purificação GFX (GE Healthcare). Foi retirada do gel a banda com o fragmento de tamanho esperado, para cada vírus, com auxílio de um bisturi, colocada em um tubo de microcentrífuga de 1,5 mL e pesada em balança analítica. Em seguida foram adicionados 300 µL do ‘Tampão de Captura’ para cada banda que pesasse até 300 mg e as que apresentaram peso anteriormente indicado, adicionou-se 100 µL para cada 100 mg. A amostra com o ‘Tampão de Captura’ foi misturada por inversão e homogeneizada em banho-maria a 60°C por 10 minutos, com inversões a cada três minutos. Após esse período, 600 µL da mistura dissolvida de cada amostra foram depositados em uma coluna GFX e incubados a temperatura ambiente por 1 minuto. Em seguida, a coluna foi colocada em um tubo coletor e centrifugada a 16.000 x g por 30 segundos. Após essa etapa, o filtrado foi descartado e adicionou-se 500 µL do ‘Tampão de Lavagem’ e centrifugou-se novamente a 16.000 x g por 30 segundos, descartando-se novamente o filtrado, transferindo-se a coluna para um novo tubo de microcentrífuga de 1,5 mL e adicionado 25 µL do ‘Tampão de Eluição’. Incubou-se por 5 minutos e centrifugou-se a 16.000 x g por 1 minuto, e estocou-se o DNA purificado a -20 °C.

2.4.11 Clonagem de Sweet potato symptomless mastrevirus 1 – SPSMV-1

Para verificação da presença de Sweet potato symptomless mastrevirus 1 - SPSMV-1 (*Mastrevirus*) em plantas de batata-doce, foi realizada PCR para todas as 100 amostras utilizadas no trabalho, uma vez que ainda não existe informação sobre a presença desta espécie viral no Brasil. Neste levantamento foram utilizados os *primers* específicos para amplificar um fragmento de 417 pb da região parcial de V1 (CP) e V2 (MP) (55F: 5'- CCTAAGTCGTCGTCGATAG-3' e 472R: 5'- TTGAGTCCAGGTAAACTGAGC-3') (Cao *et al.*, 2017). A amostra cv. Branquinha (Belém de Maria/PE) foi selecionada para amplificação

do genoma completo com os *primers* 805F: 5'- TGGATATTAGTAAACCGGGTCA-3' e 804R: 5'- CACCATTCGACGTCACAA-3' (Cao *et al.*, 2017) gerando o fragmento esperado o qual foi ligado ao vetor pGEM-TEasy, em uma reação de 10 µL total sendo 3 µL do inserto, 2 µL do tampão 10X, 1 µL da enzima T4 DNA ligase (Promega), 1 µL do vetor e 3 µL de água milliQ; essa reação foi incubada a 4°C por 12 horas. No dia seguinte, realizou-se a precipitação para retirada dos sais da amostra de forma a minimizar a interferência na eletroporação, adicionando-se 45 µL de água milliQ a ligação. Em um novo tubo adicionou-se 450 µL de N-Butanol (1:1) e acrescentou-se o diluído (50 µL) ao tubo contendo o N-Butanol e agitou-se bem. Centrifugou-se a 13.000 rpm por 10 minutos. Descartou-se o sobrenadante e deixou-se secar. Ressuspendeu-se o pélete em 4 µL de água milliQ. Em seguida, procedeu-se a transformação em células de *Escherichia coli* DH10B (MAX Efficiency® DH10B™ Competent Cells-Invitrogen™). Adicionou-se 2 µL da amostra ressuspendida à solução de células competentes (40 µL), misturou-se levemente e transferiu-se para uma cubeta para proceder a eletroporação com o eletroporador Bio-Rad MicroPulser™, seguindo instruções do fabricante. Adicionou-se 960 µL do meio LB (Luria Bertani) líquido à cubeta e misturou-se delicadamente. Todo o conteúdo da cubeta foi transferido para um microtubo (1,5 mL) e deixado a 3°C em agitação de 900 rpm por 1 hora. Decorrido esse tempo, 200 µL das células de *E. coli* transformadas foram semeadas, com auxílio de uma alça de Drigalski, em meio de cultura sólido LB com ágar contendo ampicilina (150 µg/mL), X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indol-β-D-galactoside) a 40 µg/mL, IPTG (Isopropyl-β-D-thiogalactoside) a 100 mM e incubadas a 37°C por *overnight*. Após esse período, colônias brancas foram escolhidas e numeradas. Para cada colônia, um tubo fálcon (15 mL) foi preparado contendo 3 mL de meio líquido e 3 µL de ampicilina (100 µg/ml). Cada colônia foi retirada da placa com auxílio de um palito autoclavado e riscada em uma nova placa contendo meio LB ágar (com ampicilina). Incubou-se as placas em estufa a 37 °C *overnight*. O mesmo palito que foi usado para riscar

cada colônia, foi colocado em tubo fálcon de 15 mL com 5 mL de meio LB líquido contendo ampicilina e deixou-se em agitação a 37°C *overnight*. Partindo-se de 5 mL de meio líquido, foi realizada a extração de DNA plasmidial, com a transferência de 1,5 mL do meio líquido para um novo tubo e centrifugou-se a 12.000 rpm por 2 minutos, seguindo-se do descarte do sobrenadante, tendo sido repetido o processo até que todos os 5 mL fossem centrifugados, seguindo-se com a secagem dos péletes que foram ressuspensos em 100 µL da solução 1 (glucose 50 mM, Tris HCl 25 mM e EDTA 10 mM). Adicionou-se 200 µL da solução 2 (NaOH 0,2 mM e SDS 2 %) preparada no momento. Incubou-se no gelo por 5 minutos. Adicionou-se 150 µL da solução 3 (acetato de potássio 5 M, ácido acético glacial 100 % e água) e misturou-se bem. Centrifugou-se a 12.000 rpm por 5 minutos. Transferiu-se 400 µL do sobrenadante para outro tubo. Adicionou-se 200 µL de clorofórmio e misturou-se bem. Centrifugou-se a 12.000 rpm por 5 minutos. Transferiu-se 300 µL da fase superior para um novo tubo e adicionou-se 350 µL de isopropanol. Deixou-se precipitando no freezer -20 °C por 30 minutos. Centrifugou-se a 12.000 rpm por 10 minutos e descartou-se o sobrenadante. Adicionou-se 500 µL de etanol 70 % e centrifugou-se a 12.000 rpm por 10 minutos. Descartou-se o sobrenadante e deixou-se secar. O pélete foi ressuspensado em 50 µL de água milliQ autoclavada.

Para verificar a presença da sequência recombinante, os plasmídeos foram clivados com *Eco* RI (Promega) pois o vetor pGEM T- Easy (**Figura 4**), possui sítio de restrição para esta enzima. Após a digestão, o fragmento clonado foi liberado e visualizado em gel de agarose corado com brometo de etídeo, podendo-se assim, confirmar a clonagem. A reação de clivagem foi realizada utilizando-se 10 µL de água milliQ, 1,5 µL de tampão 10X (Promega), 0,1 µL de RNase A (10 µg/mL), 0,4 µL de *Eco* RI (1U/µL – Promega), 3 µL do DNA plasmidial (250 ng/µL), para um volume final de 15 µL. Essa reação foi incubada por 16 horas a 37 °C.

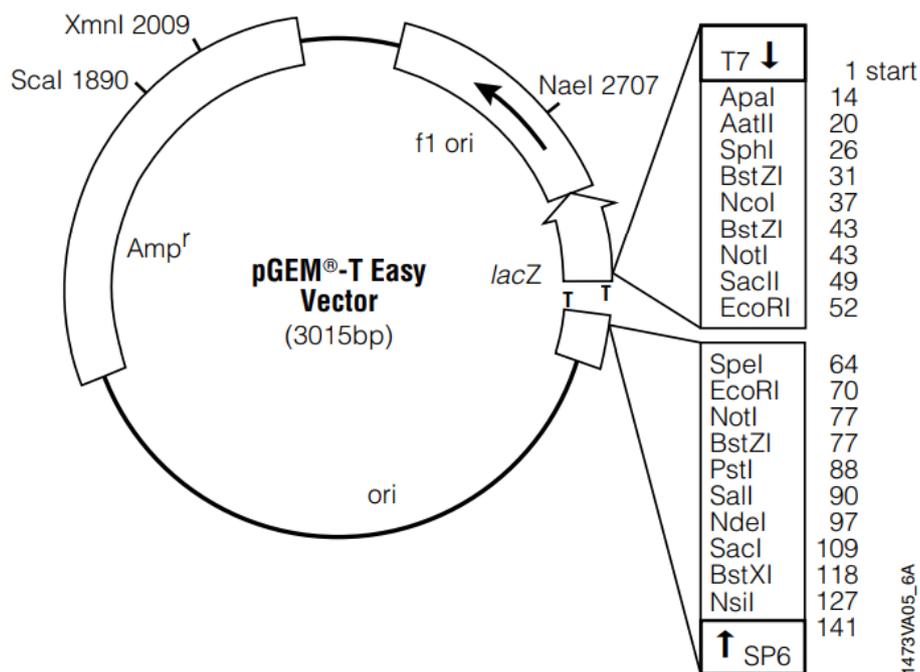


Figura 4. Mapa do vetor pGEM- T Easy utilizado para clonagem da espécie viral Sweet potato symptomless mastrevirus 1 - SPSMV-1 (*Mastrevirus*).

2.4.12 Análise filogenética

Para as análises filogenéticas foi aplicado o método de Neighbor-Joining no plugin FastTree (Price *et al.*, 2009) com *bootstrap* de 1.000 repetições, disponível no programa *Geneious* (v.10) (Kearse *et al.*, 2012). As sequências fechadas foram alinhadas pelo MAFFT (Katoh, 2013) utilizando-se o programa *Geneious* (v.10), juntamente com sequências de nucleotídeos do genoma completo de isolados dos vírus pertencentes aos gêneros *Begomovirus*, *Mastrevirus* e *Potyvirus*, depositadas no GenBank, que estão descritas nos Anexo 1, 2 e 3.

3. RESULTADOS

3.1 Detecção viral utilizando-se métodos sorológicos

3.1.1 Detecção de *Sweet potato mild mottle virus* (SPMMV) e *Sweet potato feathery mottle virus* (SPFMV) por *Dot-Enzyme Linked Immunosorbent Assay* – *Dot-ELISA*

O teste sorológico Dot-ELISA foi realizado para a detecção das espécies virais *Sweet potato mild mottle virus* SPMMV (gênero *Ipomovirus*) e *Sweet potato feathery mottle virus* SPFMV (gênero *Potyvirus*). Um total de 100 plantas foram avaliadas e por meio da utilização de antissoro específico para ambas as espécies foi possível confirmar a presença de SPMMV em 64 amostras e SPFMV em 53 amostras (**Tabela 5**).

Tabela 5. Plantas de diferentes cultivares de batata-doce (*Ipomoea batatas*) avaliadas quanto à presença das espécies virais *Sweet potato mild mottle virus*-SPMMV e *Sweet potato feathery mottle virus*-SPFMV por *Dot-Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (Dot-ELISA)

Nº	Cultivar	Local de coleta	SPMMV	SPFMV
1	Batateira	Itapissuma – PE	+ ^{/1}	+
2	Batateira	Goiana – PE	+	+
3	Vitória	Nazaré da Mata – PE	+	+
4	Ligeirinha	Pedra de Fogo – PB	+	+
5	Batata Roxa	Paudalho – PE	+	+
6	Princesa		+	+
7	Granfina	Itambé – PE	+	+
8	Parece		+	+
9	Paulistinha		+	+
10	Muciliana		+	+
11	Granfina do Talo Roxo	Goiana – PE	+	+
12	Acesso nº 1202	Itambé IPA – PE	+	- ^{/2}
13	Acesso nº 1219		-	-
14	Acesso nº 1007		+	+
15	Acesso nº 1189		+	+
16	Acesso nº 1213		+	-
17	CO Roxa		+	-
18	Pé de Pombo	São Joaquim do	+	+
19	Branquinha	Monte - PE	+	+
20	Branquinha	Belém de Maria – PE	+	+
21	Branquinha		+	+
22	Pé de Pombo		+	-
23	Pé de Pombo	Camocim de São Félix – PE	+	-
24	Branca		+	+
25	Orelha de Burro		-	+
26	Angico	BAG- UFRPE ^{/3} -PE	-	+
27	Agrestina		+	+
28	Balão Roxo		+	+

29	Branca do Talo Roxo		+	+
30	Branca de Altinho		+	+
31	Bom Nome		+	-
32	Carpinteira		+	+
33	Centenial		+	+
34	CR-06		+	-
35	Coroatã		+	-
36	Eucalipto		+	+
37	Granfina		+	-
38	Grossa da Paz		+	-
39	L7-Bege		+	+
40	Mãe de Família		+	+
41	Mineira		+	+
42	Olho de Urubu		+	+
43	Pérola		+	+
44	Pedra-02		+	+
45	Pincel		+	+
46	Rabo de Boi		+	-
47	RC-03		+	-
48	Talo Roxo		+	+
49	UFRPE-1.88		+	+
50	Var. J.G.Pierre		+	+
51	Vitorinha		+	-
52	010-CNPH		+	+
53	1RN		+	-
54	2RN		+	+
55	4RN		+	+
56	6RN		+	-
57	7RN		+	-
58	8RN	Rio Grande do Norte	+	-
59	9RN		+	-
60	10RN		+	-
61	11RN		+	-
62	12RN		+	-
63	Princesa		+	+
64	Roxinha	Brazlândia - DF	+	+
65	Brazlândia Rosada		-	+
66	Braz Rosada		+	-
67	Santa Sofia	Brasília - DF	-	+
68	29		-	+
69	Georgia Improved	Viçosa - MG	-	+
70	41	Brasília - DF	-	+

71	Balão	Manaus - AM	-	-
72	53	Brasília - DF	-	+
73	Rainha	Pompeu - MG	+	+
74	Batata Africana	Argentina	+	+
75	Batata Correntina n° 24	Brasília - DF	-	+
76	69	Brasília - DF	-	-
77	71	Não Me Toques - RS	-	-
78	80	Cangussu - RS	-	-
79	87	Campo Grande - MS	-	-
80	1796	Palmeira - SC	-	-
81	Araçá	Paudalho - PE	-	+
82	Campo 1	Camaragibe - PE	-	-
83	Campo 1	Vitória - PE	-	-
84	Campo 1	Itamaracá - PE	-	-
85	Campo 1	Igarassu - PE	-	-
86	Amélia		-	+
87	BRS Cuia		-	-
88	Beauregard		-	-
89	Canadense	FAL/UnB-DF ^{/4}	-	-
90	Coquinho		-	-
91	Rosada Prudente		-	-
92	Rubissol		-	-
93	Uruguaiana		-	-
94	Planta 1	Bonito - PE	-	-
95	Campo 1	Camaragibe - PE	-	-
96	Campo 1	Abreu e Lima - PE	-	-
97	Campo 1	Itapissuma - PE	-	-
98	Campo 1	Igarassu - PE	-	-
99	Campo 1	Mamanguape - PB	-	-
100	Cambrainha	Igarassu - PE	-	-

^{/1} (+): amostra positiva para a presença viral

^{/2} (-): amostra negativa para a presença viral

^{/3} BAG/UFRPE: Banco Ativo de Germoplasma/Universidade Federal Rural de Pernambuco

^{/4} FAL/UnB-DF: Fazenda Água Limpa/Universidade de Brasília-DF

3.2 Detecção viral por meio de análise metagenômica

3.2.1 Sequenciamento de alto desempenho - Triagem, montagem e análise dos *contigs*

O resultado para o sequenciamento *Illumina* das quatro bibliotecas geradas: RNA de *I. batatas*, RNA de *I. setosa*, DNA de *I. batatas* e DNA de *I. setosa* encontra-se na **Tabela 6**.

Tabela 6. Número total de *reads* para cada biblioteca produzida pelo sequenciamento *Illumina HiSeq* e *contigs* de sequências virais recuperadas.

Número	Biblioteca	Reads	Contigs
1	DNA-BD (batata-doce)	34.064.109	128.982
2	RNA-BD (batata-doce)	24.678.819	4.303
3	DNA-IS (<i>Ipomoea setosa</i>)	32.607.431	29.019
4	RNA-IS (<i>Ipomoea setosa</i>)	14.249.627	1.712

A análise no *Geneious* permitiu selecionar as sequências que apresentaram maior tamanho de sequência (de acordo com cada espécie) e/ou que corresponderam a espécies virais já relatadas em batata-doce.

As espécies virais encontradas na biblioteca de batata-doce foram: *Sweet potato leaf curl virus-SPLCV*, *Sweet potato mosaic virus-SPMV* e *Sweet potato golden vein associated virus-SPGVaV* (gênero *Begomovirus*, família *Geminiviridae*), *Sweet potato symptomless virus 1-SPSMV-1* (gênero *Mastrevirus*, família *Geminiviridae*), *Sweet potato chlorotic stunt virus-SPCSV RNA1 e 2* (gênero *Crinivirus*, família *Closteroviridae*), *Sweet potato feathery mottle virus-SPFMV*, *Sweet potato virus C-SPVC* e *Sweet potato virus G-SPVG* (gênero *Potyvirus*, família *Potyviridae*) e *Sweet potato C-6 virus-SPC6V* (gênero *Carlavirus*, família *Betaflexiviridae*), enquanto que na biblioteca de *I. setosa*, foram encontradas as espécies: *Sweet potato leaf curl virus-SPLCV*, *Sweet potato mosaic virus-SPMV*, *Sweet potato chlorotic stunt virus- SPCSV RNA1 e 2*, *Sweet potato feathery mottle virus-SPFMV*, *Sweet potato, virus C-SPVC*, *Sweet potato virus G-SPVG* e *Sweet potato C-6 virus- SPC6V* (**Tabela 7**).

Utilizando-se o programa *Geneious* (v. 10), foi possível recuperar os genomas completos das seguintes espécies virais: *SPFMV*, *SPVG*, *SPVC*, *SPLCV*, *SPMV* e *SPGVaV*. Os genomas de *SPFMV* e *SPVG* recuperados neste trabalho são os primeiros isolados brasileiros depositados no GenBank sob os números de acesso: MF185715-*SPFMV* e MF185716-*SPVG*.

Estas espécies também foram analisadas com os *primers* para detecção (**Tabelas 3 e 4**) nas 22 amostras de batata-doce selecionadas e encontrou-se que 19/22 foram positivas para

SPLCV e SPMV, 21/22 para SPGVaV, 14/22 para SPSMV-1, 4/22 para SPFMV, 2/22 para SPVG, 6/22 para SPVC e 3/22 para SPCSV (**Tabela 8**).

A recuperação do genoma completo de SPSMV-1 foi confirmada por meio da amplificação com *primers* específicos, clonagem e sequenciamento pelo método Sanger. Além disso, em se tratando de uma espécie nova para o Brasil, a avaliação quanto a presença viral foi estendida as 100 plantas de batata-doce, obtendo-se resultados positivos em 50/100 amostras sendo uma amostra do Norte (Amazonas), uma do Sudeste (Minas Gerais), duas do Sul (Rio Grande do Sul), seis do Centro-Oeste (Distrito Federal e Mato Grosso do Sul) e 40 da Região Nordeste (Pernambuco, Rio Grande do Norte e Paraíba).

A amostra Branquinha (Belém de Maria/PE) foi escolhida para amplificação do genoma completo utilizando-se os *primers* 805F: 5'-TGGATATTAGTAAACCGGGTCA-3' e 804R: 5'-CACCATTTCGACGTCACAA-3' (Cao *et al.*, 2017), clonada no vetor pGEM T-Easy. Dois clones foram sequenciados e apresentaram 99% identidade de nucleotídeos com a sequência SPSMV-1 (Cao *et al.*, 2017).

Tabela 7. Relação das espécies de vírus e os respectivos gêneros, identificados em cada biblioteca produzida no sequenciamento *Illumina HiSeq*

Planta	Ácido nucleico	Gênero viral	Espécie viral
<i>Ipomoea batatas</i>	DNA	<i>Begomovirus</i>	<i>Sweet potato leaf curl virus-SPLCV</i>
			<i>Sweet potato mosaic virus-SPMV</i>
		<i>Mastrevirus</i>	<i>Sweet potato golden vein associated virus-SPGVaV</i>
			<i>Sweet potato symptomless virus 1-SPSM1</i>
	RNA	<i>Crinivirus</i>	<i>Sweet potato chlorotic stunt virus- SPCSV RNA1 e 2</i>
			<i>Sweet potato feathery mottle virus-SPFMV</i>
		<i>Potyvirus</i>	<i>Sweet potato virus C-SPVC</i>
			<i>Sweet potato virus G-SPVG</i>
<i>Carlavirus</i>	<i>Sweet potato C-6 virus-SPC6V</i>		
<i>Ipomoea setosa</i>	DNA	<i>Begomovirus</i>	<i>Sweet potato leaf curl virus-SPLCV</i>
			<i>Sweet potato mosaic virus-SPMV</i>
		<i>Crinivirus</i>	<i>Sweet potato chlorotic stunt virus- SPCSV RNA1 e 2</i>
	RNA	<i>Potyvirus</i>	<i>Sweet potato feathery mottle virus-SPFMV</i>
			<i>Sweet potato virus C-SPVC</i>
		<i>Carlavirus</i>	<i>Sweet potato C-6 virus- SPC6V</i>

Tabela 8. Resultado da avaliação de amostras de batata-doce (*Ipomoea batatas*) quanto a presença de espécies virais por PCR e RT-PCR

Nº	Planta	Local	DNA				RNA			
			<i>Begomovirus</i>			<i>Mastrevirus</i>	<i>Potyvirus</i>			<i>Crinivirus</i>
			SPLCV ^{7/1}	SPMV ²	SPGVaV ³	SPSM1 ⁴	SPFMV ⁵	SPVG ⁶	SPVC ⁷	SPCSV ⁸
1	Vitória	Nazaré da Mata - PE	+ ⁹	+	+	- ¹⁰	-	-	+	-
2	Ligeirinha	Pedra de Fogo – PB	+	+	+	-	-	-	-	-
3	Princesa	Paudalho – PE	+	-	-	+	-	-	-	-
4	Paulistinha	Itambé – PE	+	+	+	-	-	-	-	-
5	Acesso nº 1202	IPA – PE	+	+	+	+	-	-	-	-
6	Branquinha	S. J. do Monte – PE	+	+	+	+	+	-	-	+
7	Branquinha	Belém de Maria – PE	+	+	+	+	+	-	+	+
8	Pé de Pombo	C. de S. Félix – PE	+	+	+	+	-	-	-	-
9	CR-06	BAG- UFRPE ¹¹ -PE	+	+	+	+	-	-	-	-
10	Mãe de família	BAG- UFRPE ¹¹ -PE	+	+	+	+	-	-	-	-
11	Olho de urubu	BAG- UFRPE ¹¹ -PE	-	+	+	-	-	-	+	-
12	Pérola	BAG- UFRPE ¹¹ -PE	-	-	+	+	-	-	-	-
13	2RN	Rio Grande do Norte	+	+	+	+	-	-	-	-
14	Roxinha	Brazlândia - DF	+	+	+	-	+	+	+	-
15	Balão	Manaus - AM	+	+	+	+	-	-	-	-
16	Rainha	Pompeu - MG	-	+	+	-	-	-	-	-
17	71RS	Não Me Toque - RS	+	+	+	-	-	+	-	+
18	87MS	Campo Grande - MS	+	-	+	+	-	-	+	-
19	1796SC	Palmeira - SC	+	+	+	+	-	-	-	-
20	Campo 1	Vitória - PE	+	+	+	+	-	-	+	-
21	Amélia	FAL/UnB ¹² -DF	+	+	+	+	+	-	-	-
22	Beauregard	FAL/UnB ¹² -DF	+	+	+	-	-	-	-	-

¹SPLCV: *Sweet potato leaf curl virus*; ²SPMV: *Sweet potato mosaic virus*; ³SPGVaV: *Sweet potato golden vein associated virus*; ⁴SPSM1: *Sweet potato symptomless mastrevirus 1*; ⁵SPFMV: *Sweet potato feathery mottle virus*; ⁶SPVG *Sweet potato virus G*; ⁷SPVC: *Sweet potato virus C*; ⁸SPCSV: *Sweet potato chlorotic stunt virus*; ⁹(+): amostras positivas; ¹⁰(-): amostras negativas; ¹¹BAG- UFRPE: Banco Ativo de Germoplasma-Universidade Federal Rural de Pernambuco; ¹²FAL-UnB: Fazenda Água Limpa-Universidade de Brasília.

3.2.2 Análise filogenética utilizando sequências de nucleotídeos da poliproteína dos isolados de potyvírus SPFMV, SPVG e SPVC

A árvore filogenética para o genoma completo (~10.800nt), utilizando-se a sequência de nucleotídeos, mostrou que os isolados de SPFMV, SPVG e SPVC, recuperados de plantas de batata-doce no Brasil, são filogeneticamente relacionados com: SPFMV - isolados da Coreia do Sul (KP115609) e Japão (AB439206), SPVG - isolados da Coreia do Sul (KM014814) e Estados Unidos (KP729269) e SPVC - isolado da Coreia do Sul (KP115621) (**Figura 5**).

3.2.3 Análise filogenética utilizando sequências de nucleotídeos do genoma completo dos isolados de geminivírus SPLCV, SPMV e SPGVaV

A árvore filogenética para o genoma completo (~2.800) dos isolados de *Begomovirus* SPLCV, SPMV e SPGVaV, que foram recuperados neste trabalho, mostraram-se filogeneticamente relacionados com: SPLCV - isolado da Coreia do Sul (KT992067), SPMV – isolado do Brasil-Brasília (FJ969831) e SPGVaV – isolados dos Estados Unidos (HQ333143 e NC015324) (**Figura 6**).

3.2.4 Análise filogenética utilizando sequências de nucleotídeos do genoma completo de mastrevírus SPSMV-1

A árvore filogenética para o genoma completo do isolado do gênero *Mastrevirus* SPSMV-1, foi produzida utilizando-se a sequência completa de 31 espécies de *Mastrevirus*, incluindo seis isolados de SPSMV-1, recentemente depositados no GenBank por Cao *et al.* (2017) (**Figura 7**). SPSMV-1 é a única espécie deste gênero que infecta batata-doce.

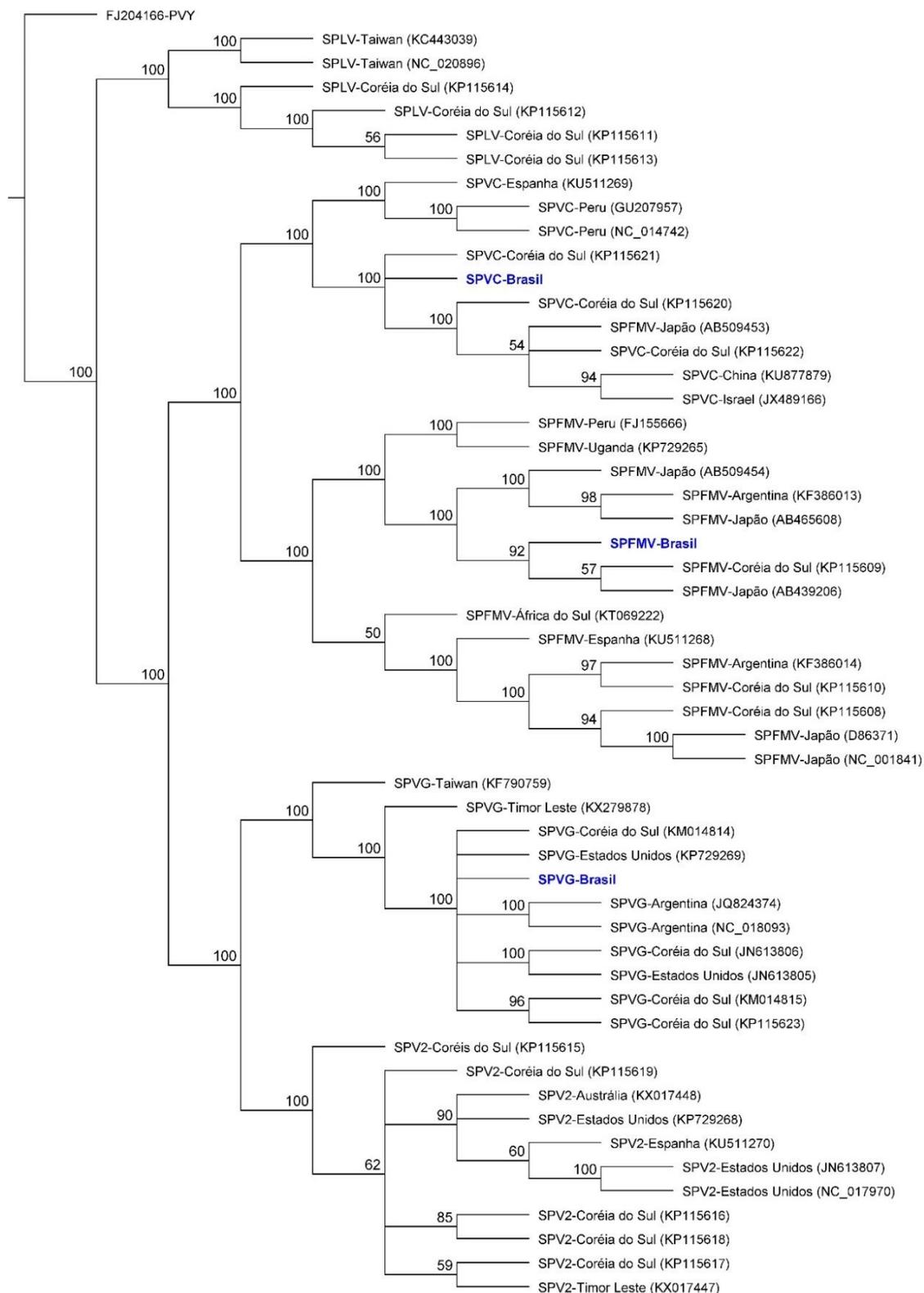


Figura 5. Árvore filogenética gerada por *Neighbor-Joining* com *bootstrap* de 1.000 repetições utilizando a sequência nucleotídica da poliproteína das espécies de *Potyvirus Sweet potato feathery mottle virus-SPFMV*, *Sweet potato virus G-SPVG* e *Sweet potato virus C-SPVC*, recuperadas neste trabalho, com sequências dos genomas completos de outros *Potyvirus* (*Sweet potato latente virus-SPLV*, *Sweet potato virus 2-SPV2*) que infectam a batata-doce (*Ipomoea batatas*) depositadas no GenBank. Os genomas recuperados neste trabalho estão destacados em azul. A espécie *Potato virus Y-PVY*, um membro do gênero *Potyvirus*, foi usado como *outgroup*.

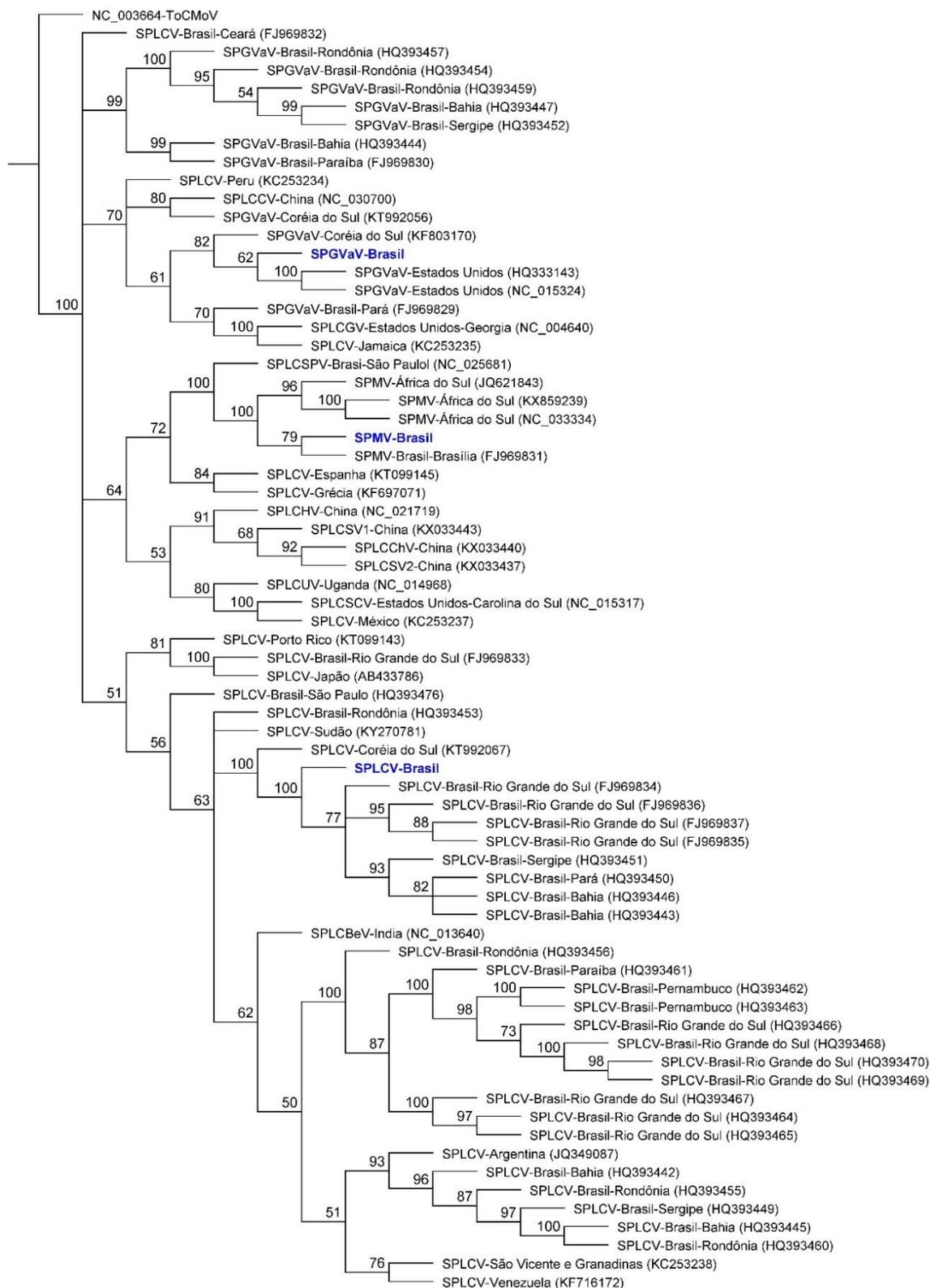


Figura 6. Árvore filogenética gerada por *Neighbor-Joining* com *bootstrap* de 1.000 repetições utilizando a sequência nucleotídica do genoma completo das espécies de *Begomovirus Sweet potato leaf curl virus-SPLCV*, *Sweet potato mosaic virus-SPMV* e *Sweet potato golden vein associated virus-SPGVaV*, recuperadas neste trabalho, com sequências dos genomas completos de outros isolados de *Begomovirus* depositados no GenBank. Os genomas recuperados neste trabalho estão destacados em azul. A espécie *Tomato chlorotic mottle virus-ToCMoV*, um membro do gênero *Begomovirus*, foi usado como *outgroup*.

4. DISCUSSÃO

A batata-doce é hospedeira de mais de 30 espécies virais, que em sua maioria encontram-se classificadas nos gêneros *Begomovirus* (11 espécies aceitas pelo ICTV e 7 espécies propostas) e *Potyvirus* (6 espécies aceitas) (Fernandes & Dusi, 2013).

No presente trabalho foram utilizadas 100 cultivares de batata-doce, originárias de diversas localidades e com representantes de todas as regiões do País, para realização de um levantamento de espécies virais que infectam a cultura no Brasil e no mundo. Inicialmente, o teste sorológico Dot-ELISA foi realizado para as espécies de *Potyvirus Sweet potato feathery mottle virus* - SPFMV (*Potyvirus*) e *Sweet potato mild mottle virus* - SPMMV (*Ipomovirus*), onde observou-se que mais de 50% das plantas estavam infectadas com estas espécies virais. Segundo Fernandes e Dusi (2013) o teste ELISA, apesar de não ser muito sensível, é o mais utilizado dentre os testes sorológicos, para diagnosticar vírus de plantas.

Pesquisas já foram realizadas no Brasil visando detectar SPMMV por NCM-ELISA (Kroth *et al.*, 2001, Souza, 2013). Kroth *et al.* (2001), investigaram espécies dos gêneros *Potyvirus* e *Ipomovirus*, porém apenas espécies de *Potyvirus* foram detectadas. Contudo, através do teste sorológico Dot-ELISA usando antissoro específico contra SPMMV Souza (2013), confirmou a presença desta espécie em 24 amostras de batata-doce do BAG e de 24 de Regiões Produtoras de Pernambuco e uma da Paraíba, sendo aquela, a primeira detecção deste vírus na cultura da batata-doce no Brasil. Apesar da detecção do SPMMV ter sido realizada, diretamente, a partir de plantas de batata-doce no referido trabalho, Kokkinos & Clark (2006) afirmam que a detecção de vírus diretamente da batata-doce pode ser dificultada devido à alta concentração de polissacarídeos e também devido aos baixos títulos virais nesta cultura.

Ipomoea setosa que também pertence à família Convolvulaceae, é uma espécie indicadora muito utilizada em estudos de detecção de vírus que infectam a batata-doce por ser sensível a

praticamente todos os vírus que infectam a cultura, sendo utilizada como porta enxerto em ensaios de indexação biológica (Fernandes & Dusi, 2013).

Com o intuito de comparar a eficiência de transmissão dos vírus da batata-doce para plantas de *I. setosa* e também comparar a quantidade de espécies virais recuperadas de cada espécie da planta, foi realizada a enxertia de amostras de 100 cultivares de batata-doce em plantas de *I. setosa*. Foi produzida uma biblioteca de DNA e uma de RNA tanto para o *pool* de batata-doce quanto para o *pool* de *I. setosa* para recuperação dos vírus e nas quais pode-se observar diferenças tanto na quantidade de *reads* gerados pelo sequenciamento *Illumina*, quanto nas espécies detectadas em cada planta. As bibliotecas de batata-doce geraram um maior número de *reads* e *contigs* e também pode-se encontrar duas espécies a mais que em *I. setosa*: Sweet potato golden vein associated virus-SPGVaV e Sweet potato symptomless virus 1-SPSMV-1.

Kashif *et al.* (2012) realizaram a detecção de vírus em amostras de batata-doce coletadas em Honduras e Guatemala sequenciando siRNAs (small RNAs) por *Illumina Genome Analyzer*. Como resultado, esses autores detectaram seis espécies virais: *Sweet potato feathery mottle virus* (SPFMV) e *Sweet potato virus C* (SPVC) (família *Potyviridae*, gênero *Potyvirus*), *Sweet potato chlorotic stunt virus strain WA* (SPCSV-WA) (família *Closteroviridae*, gênero *Crinivirus*), *Sweet potato pakakuy virus* estirpes A e B (SPPV-A e B) (família *Caulimoviridae*, gênero *Badnavirus*) e *Sweet potato leaf curl Georgia virus* (SPLCGV), (família *Geminiviridae*, gênero *Begomovirus*). Kashif *et al.* (2012) concluíram também que o sequenciamento de alto rendimento de siRNAs é adequado para utilização como um método confiável para a detecção de vírus de plantas.

A espécie viral SPSMV-1 teve seu genoma, parcialmente sequenciado pela primeira vez por Kreuze *et al.* (2009), quando realizaram, pela primeira vez, o sequenciamento de alto desempenho em plantas de batata-doce e propuseram esta espécie como pertencente ao gênero *Mastrevirus*.

Recentemente, Cao *et al.* (2017) também realizaram sequenciamento *Illumina HiSeq* de plantas de batata-doce da China e conseguiram recuperar o genoma completo de SPSMV-1. O isolado encontrado neste trabalho está filogeneticamente relacionado com os isolados depositados no GenBank por Cao *et al.* (2017).

No Brasil, este é o primeiro relato da detecção de SPSMV-1 infectando batata-doce. A detecção de SPSMV-1 em 50 das 100 amostras analisadas indica que esta espécie está bem distribuída no País. Futuramente mais estudos, incluindo ensaios de transmissão e o cumprimento dos Postulados de Koch, devem ser realizados para avaliar a interação do SPSMV-1 com outras espécies virais de importância econômica infectando batata-doce no Brasil.

Tugume *et al.* (2016), realizaram um estudo para determinar a incidência de *Sweet potato chlorotic fleck virus* - SPCFV (família *Betaflexiviridae*, gênero *Carlavirus*) e SPCSV e as taxas de co-infecção com SPFMV e SPMMV, em espécies de batata-doce selvagens localizadas nas proximidades de batatas-doces cultivadas na Uganda. Os autores, encontraram co-infecções de SPCSV com SPFMV e SPCSV com SPMMV em seis de 1.224 plantas avaliadas. Infecção tripla também foi encontrada com SPCSV, SPFMV e SPMMV em 5 das 1.224 plantas avaliadas.

No presente trabalho, também foram identificadas infecções mistas em todas as 22 amostras avaliadas, sendo que na cv. Branquinha/Belém de Maria pode-se detectar sete (SPLCV, SPMV, SPGVaV, SPSMV-1, SPFMV, SPVC e SPCSV) das oito espécies virais pesquisadas. Como pode-se observar, a diversidade de espécies virais que é possível estar presente na mesma planta de batata-doce pode ser elevada, o que ressalta a importância da identificação destes vírus.

5. CONCLUSÕES

- **NGS é uma poderosa ferramenta para estudos de viroma. Em diferentes cultivares de batata-doce provenientes de cinco regiões brasileiras (Norte, Nordeste, Sul, Sudeste e Centro-Oeste) foi possível detectar nove espécies virais, classificadas em cinco gêneros distintos (*Begomovirus*, *Mastrevirus*, *Potyvirus*, *Crinivirus* e *Carlavirus*).** Genomas completos foram obtidos para três espécies de *Potyvirus* (SPFMV, SPVG e SPVC), uma de *Crinivirus* (SPCSV RNA1 e 2), três de *Begomovirus* (SPLCV, SPMV e SPGVaV) e uma de *Mastrevirus* (SPSMV-1).
- **NGS comparativo entre *Ipomoea batatas* v.s. *Ipomoea setosa* enxertada com amostras de batata-doce indicou diferenças na detecção viral indicando que a enxertia pode restringir a passagem de espécies virais do enxerto para o porta-enxerto.** O uso de enxertias em *Ipomoea setosa* como medida rotineira para estudos de detecção viral são amplamente utilizados no Brasil e no mundo. Aqui foi possível constatar que as espécies Sweet potato golden vein associated virus-SPGVaV (gênero *Begomovirus*) e Sweet potato symptomless mastrevirus 1-SPSMV-1 (gênero *Mastrevirus*) tiveram seus genomas recuperados por meio do NGS para batata-doce e não para *Ipomoea setosa* enxertada, indicando que algum tipo de restrição ao movimento dos agentes virais ou sua baixa concentração podem interferir com a localização viral no enxerto.
- **Não detecção de *Sweet potato mild mottle virus* (SPMMV, gênero *Ipomovirus*) no Brasil por meio de NGS.** A detecção desta espécie apenas por sorologia indicou não ser um teste robusto, isoladamente, na identificação do SPMMV, sugerindo a presença de epítomos em comum entre esta espécie de *Ipomovirus* com alguma outra espécie viral.

- **Primeiro relato de SPSMV-1 no Brasil.** O genoma completo desta espécie viral foi obtido por NGS e por clonagem de vírus presente na amostra da cultivar ‘Branquinha’ (Belém de Maria/PE). Dois clones foram obtidos. Uma alta porcentagem de amostras (50%) se mostrou infectada com este vírus como demonstrado em ensaios via PCR.

6. LITERATURA CITADA

ALAM, I.; SHARMIN, S.A.; NAHER, M.K.; ALAM, M.J.; ANISUZZAMAN, M. & ALAM, M. F. 2013. Elimination and detection of viruses in meristem-derived plantlets of sweetpotato as a low-cost option toward commercialization. *3 Biotech* 3: 153-164.

ALBUQUERQUE, L.C.; INOUE-NAGATA, A.K.; PINHEIRO, B.; RESENDE, R.O.; MORIONES, E. & NAVAS-CASTILLO, J. 2012. Genetic diversity and recombination analysis of sweepoviruses from Brazil. *Virology Journal* 9: 241-254.

AUSTIN, D.F. 1977. Hybrid haploids in *Ipomoea* section batatas. *Journal of Heredity* 68: 259-260.

BARZON, L.; LAVEZZO, E.; MILITELLO, V.; TOPPO, S. & PALÙ, G. 2011. Applications of Next-Generation Sequencing Technologies to Diagnostic Virology. *International Journal of Molecular Sciences* 12: 7861-7884.

BOITEUX, L.S.; FONSECA, M.E.N. & SIMON P.W. 1999. Effects of plant tissue and DNA purification method on randomly amplified polymorphic DNA-based genetic fingerprinting analysis in carrot. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 124: 32-38.

CAO, M.; LAN, P.; LI, F.; ABAD, J.; ZHOU, C. & LI, R. 2017. Genome characterization of sweet potato symptomless virus 1: a mastrevirus with an unusual nonanucleotide sequence. *Archives of virology*, 162: 2881-2884.

CASTRO, L.A.S.; ROCHA, N.E.M. & ABRANTES, V.L. 2008. Avaliação biológica de viroses em plantas matrizes e mudas de batata-doce (*Ipomoea batatas*). *Circular Técnica*, 75: 1-12.

CUELLAR, W.J.; SOUZA, J.; BARRANTES, I.; FUENTES, S. & KREUZE, J.F. 2011. Distinct cavemoviruses interact synergistically with Sweet potato chlorotic stunt virus (genus *Crinivirus*) in cultivated sweet potato. *Journal of General Virology* 92: 1233- 1243.

CUELLAR, W.J.; GALVEZ, M.; FUENTES, S.; TUGUME, J. & KREUZE, J. 2015. Synergistic interactions of begomoviruses with *Sweet potato chlorotic stunt virus* (genus *Crinivirus*) in sweet potato (*Ipomoea batatas* L.). *Molecular Plant Pathology* 16: 459-471.

- DE SOUZA, J. & CUELLAR, W.J. Sequence analysis of the replicase gene of 'sweet potato caulimo-like virus' suggests that this virus is a distinct member of the genus Cavemovirus. 2011. *Archives of Virology* 156: 535-537.
- FERNANDES, F.R. & DUSI, A.N. 2013. Viroses da batata-doce no Brasil: importância e principais medidas de controle. Circular Técnica: 126.
- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. Faostat 2014. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567#ancor>>. Acesso em: 13 de set. 2015.
- FUENTES, S.; MAYO, M.A.; JOLLY, C.A.; NAKANO, M.; QUERCI, M. & SALAZAR, L.F. 1996. A novel luteovirus from sweet potato, sweet potato leaf speckling virus. *Annals of Applied Biology* 128:491-504.
- INOUE-NAGATA, A.K.; ALBUQUERQUE, L.C.; ROCHA, W.B. & NAGATA, T. 2004. A simple method for cloning the complete begomovirus genome using the bacteriophage phi 29 DNA polymerase. *Journal of Virological Methods* 116: 209-211.
- KASHIF, M.; PIETILÄ, S.; ARTOLA, K.; JONES, R.A.C.; TUGUME, A.K.; MÄKINEN, V. & VALKONEN, J.P.T. 2012. Detection of Viruses in Sweetpotato from Honduras and Guatemala Augmented by Deep-Sequencing of Small-RNAs. *Plant Disease* 96: 1430-1437.
- KATOH, S. 2013. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Molecular Biology and Evolution* 30: 772-780.
- KEARSE, M.; MOIR, R.; WILSON, A.; STONES-HAVAS, S.; CHEUNG, M.; STURROCK, S.; BUXTON, S.; COOPER, A.; MARKOWITZ, S.; DURAN, C.; THIERER, T.; ASHTON, B.; MENTJIES, P. & DRUMMOND, A. 2012. Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analyses of sequences data. *Bioinformatics* 28: 1647-1649.
- KOKKINOS, C.D. & CLARK, C.A. 2006. Real-time PCR assays for detection and quantification of sweetpotato viruses. *Plant Disease* 90: 783-788.
- KREUZE, J.F.; PEREZ, A.; UNTIVEROS, M.; QUISPE, D.; FUENTES, S.; BARKER, I. & SIMON, R. 2009. Complete viral genome sequence and discovery of novel viruses by deep sequencing of small RNAs: A generic method for diagnosis, discovery and sequencing of viruses. *Virology* 388: 1-7.
- KROTH, L.L.; DANIELS, J. & PIEROBOM, C.R. 2004. Degenerescência da batata-doce no Rio grande do sul. *Revista Brasileira Agrociência* 10: 79-82.
- KROTH, L.L.; FUENTES, S.; SALAZAR, L. F. & DANIELS, J. 2001. Detecção sorológica de vírus por ncm-elisa em lavouras de batata-doce no Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. *Revista Brasileira de Agrociência* 7: 117-119.

LOZANO, G.; TRENADO, H.P.; VALVERDE, R.A. & NAVAS-CASTILLO, J. 2009. Novel begomovirus species of recombinant nature in sweet potato (*Ipomoea batatas*) and *Ipomoea indica*: taxonomic and phylogenetic implications. *Journal of General Virology* 90: 2550-2562.

MOKILI, J.L.; ROHWER, F. & DUTILH, B.E. 2012. Metagenomics and future perspectives in virus discovery. *Current Opinion in Virology* 2: 63-77.

OLIVEIRA, A.P.; GONDIM, P.C.; SILVA, O.P.R.; OLIVEIRA, A.N.P.; GONDIM, S.C. & SILVA, J.A. 2013. Produção e teor de amido da batata-doce em cultivo sob adubação com matéria orgânica. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental* 17: 830-834.

PIO-RIBEIRO, G.; WINTER, S.; HAMILTON, R.I.; ASSIS FILHO, F.M. & DA PAZ, C.D. 1994. First Report of Sweetpotato Virus Disease-Associated Closterovirus in Brazil. *Disease Note* 78:1122B.

PRICE, M.N.; DEHAL, P.S. & ARKIN, A.P. 2009. FastTree: Computing Large Minimum-Evolution Trees with Profiles instead of a Distance Matrix. *Molecular Biology and Evolution* 26:1641-1650.

PRODUÇÃO AGRÍCOLA MUNICIPAL: Culturas temporárias e permanentes. 2016. Disponível em: <https://sidra.ibge.gov.br/pesquisa/pam/tabelas>. Acesso em: 11 Nov. 2017.

RODRIGUEZ-AMAYA, D.B.; KIMURA, M.; AMAYA-FARFAN, J. 2008. Fontes Brasileiras de Carotenóides. Ministério do Meio Ambiente – MMA.

RUBINSTEIN, G. & CZOSNEK, H. 1997. Long-term association of tomato yellow leaf curl virus (TYLCV) with its whitefly vector *Bemisia tabaci*: effect on the insect transmission capacity, longevity and fecundity. *Journal of General Virology* 78: 2683-2689.

RUKARWA, R.J.; MASHINGAIDZE, A.B.; KYAMANYWA, S. & MUKASA, S.B. 2010. Detection and elimination of sweet potato viruses. *African Crop Science Journal* 18: 223-233.

SCHAEFERS, G.A. & TERRY, E.R. 1976. Insect transmission of sweet potato disease agents in Nigeria. *Phytopathology* 66: 642-645.

SCHULTZ, A.R. 1968. Introdução ao estudo da botânica sistemática. 3 ed. Porto Alegre; Globo, v.2.

SIMMONDS, P.; ADAMS, M.J.; BENKO, M.; BREITBART, M.; BRISTER, J.R.; CARSTENS, E.B.; DAVISON, A.J.; DELWART, E.; GORBALENYA, A.E.; HARRACH, B.; HULL, R.; KING, A.M.Q.; KOONIN, E.V.; KRUPOVIC, M.; KUHN, J.H.; LEFKOWITZ, E.J.; NIBERT, M.L.; ORTON, R.; ROOSSINCK, M.J.; SABANADZOVIC, S.; SULLIVAN, M.B.; SUTTLE, C.A.; TESH, R.B.; VAN DER VLUGT, R.A.; VARSANI, A. & ZERBINI, F.M. 2017. Virus taxonomy in the age of metagenomics. *Nature Reviews| Microbiology* 15: 161.

SOSSAH, F.L.; APPIAH, A.S.; ODURO, V.; AMOATEY, H.M.; OWUSU, G.K.; OPPONG, A.; LAMPTEY, J.N.L.; CAREY, E.E. & FUENTES, S. 2015. Incidence of sweet potato viruses in the coastal savannah agro-ecological zone of Ghana. *Journal of Plant Pathology*: 97: 109-117.

SOUZA, C.A. 2013. Detecção de begomovírus e ipomovírus em genótipos de batata-doce nos Estado de Pernambuco e Paraíba e análise de fontes de resistência a *Tomato chlorotic mottle virus* e *Potato virus Y* em berinjela. Dissertação de Mestrado.

TUGUME, A.K.; MUKASA, S.B. & VALKONEN, J.P.T. 2016. Mixed Infections of Four Viruses, the Incidence and Phylogenetic Relationships of *Sweet Potato Chlorotic Fleck Virus (Betaflexiviridae)* Isolates in Wild Species and Sweetpotatoes in Uganda and Evidence of Distinct Isolates in East Africa. Plos One DOI:10.1371/journal.pone.0167769.

UNTIVEROS, M.; FUENTES, S. & SALAZAR, L.F. 2007. Synergistic Interaction of Sweet potato chlorotic stunt virus (Crinivirus) with Carla-, Cucumo-, Ipomo-, and Potyviruses Infecting Sweet Potato. Plant Disease 91: 669-676.

VARGAS, P.F.; GODOY, D.R.Z.; ALMEIDA, L.C.F. & CASTOLD, R. 2017. Agronomic characterization of sweet potato accessions. Comunicata Scientiae 8: 116-125.

CAPÍTULO 3

**SELEÇÃO POR *HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY* –
HPLC DE GENÓTIPOS DE BATATA-DOCE COM ALTO TEOR DE
BETA-CAROTENO E PRODUÇÃO DE MATERIAIS LIVRES DE VÍRUS**

Seleção por *High Performance Liquid Chromatography* – HPLC de genótipos de batata-doce com alto teor de beta-caroteno e produção de materiais livres de vírus

RESUMO

A batata-doce (*Ipomoea batatas* L) apresenta alto potencial de produção apesar das diversas pragas e patógenos que acometem a cultura. Dentre os patógenos os mais importantes para a cultura são os vírus devido, principalmente, ao modo tradicional de cultivo da batata-doce que se é feito por meio da utilização de ramas-semente, favorecendo o acúmulo de espécies virais ao longo dos ciclos da cultura. Esta hortaliça é um dos alimentos mais ricos em beta-caroteno, o qual é o principal carotenóide precursor da vitamina A. O beta-caroteno é o pigmento responsável pelas cores amarelo, alaranjado e vermelho nas plantas e a quantificação destes pigmentos da batata-doce é realizada por *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC). O objetivo deste capítulo foi selecionar cultivares de batata-doce ricas em beta-caroteno analisando os teores por HPLC e regenerar plantas saudáveis por meio do cultivo, *in vitro*, de meristemas apicais. Para as análises foram utilizadas 100 cultivares de batata-doce, oriundas das cinco regiões do Brasil. Os carotenoides foram extraídos e quantificados em cromatógrafo LC-20A Prominence. Para a avaliação quanto a presença de espécies virais as plantas com maiores teores de beta-caroteno foram testadas utilizando-se *primers* específicos para sete espécies de vírus que infectam a batata-doce. Estas foram submetidas a cultivo de meristemas dos quais foi possível regenerar novas plantas que foram indexadas, para as mesmas sete espécies virais citadas acima, para a confirmação da limpeza. Quatro amostras (Amélia, Beauregard, CR-06 e Pérola) foram selecionadas por HPLC e destas, três (Amélia, CR-06 e Pérola) foram regeneradas, sendo que uma amostra da cultivar CR-06 se mostrou livre de infecção por todas as espécies de vírus avaliadas.

Palavras-chave: *Ipomoea batatas*, carotenoides, cultura de tecidos

Selection by High Performance Liquid Chromatography - HPLC of sweet potato genotypes with high beta-carotene content and production of virus-free materials

ABSTRACT

Sweet potato (*Ipomoea batatas* L) has high production potential despite the various pests and pathogens that enter the crop. Among the pathogens the most important for the culture are the viruses, mainly due to the traditional mode of sweet potato cultivation that occurs through the use of seed branches, which favors the accumulation of viral species throughout the crop cycles. This vegetable is one of the richest foods in beta carotene, which is the main carotenoid precursor of vitamin A. Beta carotene is the pigment responsible for the colors yellow, orange and red in the plants and the quantification of these sweet potato pigments is performed by High Performance Liquid Chromatography (HPLC). The objective of this chapter was to select beta-carotene-rich sweet potato cultivars by analyzing HPLC contents and regenerating healthy plants by in vitro cultivation of apical meristems. For the analysis, 100 sweet potato cultivars were used, from the five regions of Brazil. Carotenoids were extracted and quantified on LC-20A Prominence chromatograph. For the evaluation of the presence of viral species, the plants with the highest levels of beta-carotene were analyzed using specific primers for seven virus species reported infecting sweet potato. These plants were submitted to meristem cultivation from which new plants could be regenerated. These plants were indexed for the same seven viral species mentioned above, in order to confirm the efficiency of the virus cleaning process. Four cultivars were evaluated (Amélia, Beauregard, CR-06 and Pérola) were selected by HPLC. Three of them (Amélia, CR-06 and Pérola) were regenerated. One single sample of CR-06 was found to be free for all virus species evaluated.

Keywords: *Ipomoea batatas*, carotenoids, tissue culture

1. INTRODUÇÃO

A batata-doce (*Ipomoea batatas* Lam) (Schultz, 1968) é a única espécie da família Convolvulaceae que é utilizada na alimentação (Castro *et al.*, 2008). Possui hábito perene e apresenta-se como uma das principais fontes de alimentos, tanto para consumo humano quanto para ração animal, além de ser uma contribuição significativa como suplemento energético e fonte fitoquímica de nutrição (Shekhar *et al.*, 2015).

A batata-doce tem sido cultivada no Brasil há muitos anos e encontra-se atualmente bem disseminada por todas as regiões, sendo geralmente cultivada por pequenos produtores, em sistemas agrícolas com reduzida entrada de insumos (Souza, 2000). Esta hortaliça é a sétima cultura mais consumida no mundo depois do trigo, arroz, milho, batata, cevada e mandioca (Faostat, 2014, Vargas *et al.*, 2017).

O potencial de produção da batata-doce é alto, sendo uma das plantas com maior capacidade de produzir energia por unidade de área e tempo (kcal/ ha/dia), chegando a cerca de 30 a 40 toneladas de biomassa por hectare (Castro, 2015). As raízes desta hortaliça vêm sendo amplamente utilizadas, por exemplo, para produção de macarrão à base de amido, alimentos de padaria, lanches, produtos de confeitaria, xarope de amido, álcool e indústrias cervejeiras na China (Zhou *et al.*, 2017).

Uma avaliação da composição nutricional de folhas de 40 cultivares de batata-doce foi realizada por Sun *et al.* (2014), na China, onde concluíram que as folhas desta cultura são boas fontes de proteína, fibra e minerais, especialmente K, P, Ca, Mg, Fe, Mn e Cu. Além disso, observaram também a atividade de polifenóis como antioxidantes importantes nas folhas de batata-doce. Por esta razão e por conterem vários nutrientes e compostos bioativos Sun *et al.* (2014) recomendam o consumo das folhas de batata-doce.

Segundo Block (1994), esta hortaliça é um dos alimentos com os maiores teores de beta-caroteno, principal carotenóide precursor da vitamina A na natureza. A vitamina A pode ser

obtida tanto por alimentos de origem animal como fígado, produtos lácteos, peixes ou carnes (Graebner *et al.*, 2004) como por alimentos de origem vegetal que contenham o beta-caroteno, pois este nutriente é passível de ser transformado, biologicamente, em vitamina A no fígado (Tang, 2010).

Os carotenóides apresentam como efeitos benéficos à saúde, o fato de serem precursores de vitamina A e também atuarem no fortalecimento do sistema imunológico e na diminuição do risco de doenças degenerativas (Rodrigues-Amaya *et al.*, 2008). Contudo a composição varia com as condições climáticas, sistema de cultivo, época de colheita, tempo e condições de armazenamento e cultivares (Da Silveira *et al.*, 2011).

Rodrigues-Amaya *et al.*, (2008) fornece uma ‘Tabela brasileira de composição de carotenóides em alimentos’ na qual elenca os alimentos brasileiros que contém carotenóides. Assim, segundo essa tabela, os cinco alimentos mais ricos em beta-caroteno são: o buriti (*Mauritia flexuosa*) com 364 µg/g, a abóbora (*Cucurbita moschata*) cv. Baianinha com 235 µg/g, o caruru (*Amaranthus viridis*) com 112 µg/g, o hortelã (*Mentha spicata*) com 84 µg/g e cenoura (*Daucus carota*) cv nantes com 62 µg/g. A batata-doce não foi incluída na lista pois no Brasil as variedades comercializadas são usualmente brancas, ou seja, de baixo conteúdo em carotenóides (Rodrigues-Amaya *et al.*, 2008). Em vista disso, a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa) vem realizando seleção de clones de batata-doce para inclusão no programa BioFORT: Biofortificação no Brasil, que desenvolve diversos produtos agrícolas naturais com quantidades de nutrientes capazes de suprir a necessidade nutricional do corpo humano e disponibilizar aos agricultores e, por conseguinte aos consumidores, cultivares de batata-doce com melhores teores de beta-caroteno como incentivo de consumo destas variedades (BioFort, 2017).

O termo “carotenóides” refere-se a uma classe de pigmentos, sintetizados em plantas, algas e bactérias fotossintetizantes e também em alguns peixes. São responsáveis pelas cores amarelo, alaranjado e vermelho nas plantas, por exemplo (Khachik *et al.*, 1995).

Carotenóides apresentam uma estrutura de cadeia longa com duplas ligações entre carbonos e simetria bilateral. Os diferentes compostos são gerados essencialmente por modificações em uma estrutura básica, especialmente com formação de anéis nas extremidades e pela adição de átomos de oxigênio, que fornece as características de cor e capacidade antioxidante (Rao & Rao, 2007). A presença de duplas ligações conjugadas favorece a isomerização da forma *cis* para a *trans*, sendo a última mais estável e a mais comum em plantas. Contudo, pouco se conhece a respeito da influência biológica dessa isomerização na saúde humana (Horst & Moreno, 2009).

Os carotenóides são tetraterpenóides com 40 carbonos formados pela união cauda-cabeça de oito unidades isoprenoides C5, exceto na posição central, onde a junção ocorre no sentido cauda-cauda, invertendo assim a ordem e resultando numa molécula simétrica (Rodrigues-Amaya *et al.*, 2008).

Para a quantificação dos carotenóides da batata-doce, a técnica analítica mais usual é a *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC) (Rodrigues-Amaya *et al.*, 2008). HPLC é uma metodologia que separa compostos químicos em solução e vem sendo amplamente utilizada como ferramenta em várias áreas da química e biologia (Reuhs, 2017).

O cultivo da planta de batata-doce, embora seja facilitado pela extrema rusticidade e adaptação a diversos climas apresenta um fator limitante quando se pensa em doenças, principalmente as de origem viral (Oliveira *et al.*, 2008). A importância econômica e social dessa cultura é resultante da rusticidade, ampla adaptação climática e elevada capacidade de produção de energia em curto espaço de tempo (Amaro *et al.*, 2017).

Apesar se sua característica rusticidade, em termos de cultivo, a batata-doce pode ser acometida por diversas pragas e patógenos, dentre os quais os vírus apresentam grande importância devido ao tradicional modo de propagação da cultura que é realizada de forma vegetativa, utilizando-se ramos da planta mãe, o que permite a contínua transmissão para os sucessivos cultivos e representa o fator mais importante no desenvolvimento da cultura, pois favorece a disseminação de doenças fúngicas, bacterianas e viróticas (Castro, Dutra & Becker, 2016).

Os vírus que se acumulam na batata-doce podem atuar em sinergismo através da formação de complexos virais, agravando a doença e provocando danos consideráveis para a cultura, como redução e deformação foliar, refletindo na qualidade das raízes, redução na quantidade e qualidade da produção, fenômeno referido como degenerescência (Fernandes, 2013; Pio-Ribeiro *et al.*, 2016).

Para produtores familiares, o controle de doenças virais ainda é difícil e a produção de material de plantio sadio é um passo importante no controle de doenças virais de batata-doce (IPC, 2015), que pode levar a melhoria da qualidade da batata-semente, e aumento da produção (Rukarwa *et al.*, 2010).

De acordo com Untiveros *et al.* (2007), a maioria das infecções simples em batata-doce induzem sintomas leves ou são assintomáticas o que na maioria das vezes acarreta a disseminação dos vírus por intermédio dos produtores devido ao fato desta cultura ser tradicionalmente propagada de forma vegetativa. Desta forma a plantação subsequente de batata-doce tende a aumentar a incidência de plantas infectadas com vírus durante os sucessivos cultivos, resultando em uma acentuada queda na produção pois dependendo das espécies virais que estão interagindo, a queda de produtividade pode variar em relação a plantas sadias (Kreuze & Fuentes, 2008).

Segundo Torres *et al.* (1998), uma alternativa de controle é a aplicação de técnicas de cultura de tecidos, sobretudo a de cultura de ápices caulinares, para a obtenção de plantas de batata-doce de alta qualidade fitossanitária, partindo-se de genótipos infectados com vírus. As plantas regeneradas, isentas de vírus apresentam maior produtividade em relação às infectadas (Rós *et al.*, 2012). De acordo com Castro *et al.*, (2016) uma das atividades mais importantes para o desenvolvimento da cultura da batata-doce consiste na disponibilidade de mudas com elevados padrões técnicos e fitossanitários.

Desta forma, o objetivo deste trabalho foi selecionar genótipos de batata-doce, usando cromatografia líquida (*High Performance Liquid Chromatography* – HPLC), ricos em beta-caroteno e efetuar a eliminação dos vírus por meio de técnicas de cultivo *in vitro*, aliando qualidade alimentar e produtividade. Para isto, 100 cultivares de batata-doce provenientes de diferentes regiões do Brasil foram avaliadas em campo e analisados por HPLC. Destas, 4 foram selecionadas para limpeza clonal e 3 foram regeneradas no final do processo conforme descrito na metodologia.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Origem e manutenção das plantas de batata-doce

As plantas de batata-doce foram mantidas em casa de vegetação e campo da Estação Experimental de Biologia da UnB (EEB-UnB) com três repetições em vasos mantidos separados em casa de vegetação.

2.2 Produção das raízes de batata-doce para análise por *High Performance Liquid Chromatography* – HPLC

Para o desenvolvimento das raízes da batata-doce, o plantio foi efetuado em área de campo da EEB. No preparo do solo foram aplicados calcário e adubação com N-P-K (04-14-08) por canteiro que foi preparado nas dimensões de 1m x 1m de tamanho e espaçamento de 50 cm entre canteiros e 60 cm entre linhas (**Figura 1**), sendo plantadas manualmente e com cinco

repetições (cinco ramas, com cerca de 30 cm, de cada planta por canteiro). As ramas foram retiradas de plantas cultivadas em casa de vegetação. Durante o ciclo da cultura foram realizadas três capinas, como recomendado por Filgueira *et al.* (2008). Aos 120 dias após o plantio, as raízes foram colhidas, fotografadas e pesadas (**Figura 2**). Para a análise do teor de beta-caroteno por meio de HPLC, as amostras foram selecionadas pelo desenvolvimento, quanto ao tamanho e peso, sendo escolhidas as três melhores de cada acesso. Após a seleção, as amostras foram então levadas para o laboratório de campo da EEB para realização de procedimentos de extração visando análises de colorimetria e teor de beta-caroteno. Os procedimentos foram realizados sob condições de baixa luminosidade e de forma rápida para evitar possível foto-oxidação dos compostos químicos.



Figura 1. Cultivo de batata-doce (*Ipomoea batatas*) no campo da Estação Experimental de Biologia da Universidade de Brasília (Foto: Caroline Souza).

2.3 Origem das amostras para análise por *High Performance Liquid Chromatography* – HPLC e cultura de tecidos

Foram analisadas 100 amostras, sendo 27 amostras de batata-doce originárias do Banco Ativo de Germoplasma (BAG) da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), cinco do BAG do Empresa Pernambucana de Pesquisa Agropecuária (IPA), 29 amostras de diferentes

regiões produtoras de Pernambuco (RPP) e 39 de diferentes estados e regiões do Brasil e uma amostra da Argentina (**Tabela 1**).

Tabela 1. Cultivares de batata-doce (*Ipomoea batatas*) utilizadas neste trabalho

Número	Cultivar	Local de coleta
1	Batateira	Itapissuma – PE
2	Batateira	Goiana – PE
3	Vitória	Nazaré da Mata – PE
4	Ligeirinha	Pedra de Fogo – PB
5	Batata Roxa	Paudalho – PE
6	Princesa	
7	Granfina	Itambé – PE
8	Parece	
9	Paulistinha	
10	Muciliana	
11	Granfina do Talo Roxo	Goiana – PE
12	Acesso nº 1202	BAG – IPA ¹ – PE
13	Acesso nº 1219	
14	Acesso nº 1007	
15	Acesso nº 1189	
16	Acesso nº 1213	
17	CO Roxa	São Joaquim do Monte – PE
18	Pé de Pombo	
19	Branquinha	
20	Branquinha	Belém de Maria – PE
21	Branquinha	
22	Pé de Pombo	
23	Pé de Pombo	Camocim de São Félix – PE
24	Branca	
25	Orelha de Burro	
26	Angico	BAG – UFRPE-PE ²
27	Agrestina	
28	Balão Roxo	
29	Branca do Talo Roxo	
30	Branca de Altinho	
31	Bom Nome	
32	Carpinteira	
33	Centenial	
34	CR-06	
35	Coroatã	

36	Eucalipto	
37	Granfina	
38	Grossa da Paz	
39	L7-Bege	
40	Mãe de Família	
41	Mineira	
42	Olho de Urubu	
43	Pérola	
44	Pedra	
45	Pincel	
46	Rabo de Boi	
47	RC-03	
48	Talo Roxo	
49	UFRPE-1.88	
50	Var. J.G.Pierre	
51	Vitorinha	
52	010-CNPH	
53	1RN	
54	2RN	
55	4RN	
56	6RN	
57	7RN	
58	8RN	Rio Grande do Norte
59	9RN	
60	10RN	
61	11RN	
62	12RN	
63	Princesa	Brazlândia – DF
64	Roxinha	
65	Brazlândia Rosada	
66	Braz Rosada	Brasília – DF
67	Santa Sofia	
68	29DF	
69	Georgia Improved	Viçosa – MG
70	41DF	Brasília – DF
71	Balão	Manaus – AM
72	53DF	Brasília – DF
73	Rainha	Pompeu – MG
74	Batata Africana	Argentina – FAL
75	Batata Correntina	Brasília – DF
76	69DF	
77	71RS	Não Me Toques – RS
78	80RS	Cangussu – RS

79	87MS	Campo Grande – MS
80	1796SC	Palmeira – SC
81	Araçá	Paudalho – PE
82	Campo 1	Camaragibe – PE
83	Campo 1	Vitória – PE
84	Campo 1	Itamaracá – PE
85	Campo 1	Igarassu – PE
86	Amélia	
87	BRS Cuia	
88	Beauregard	
89	Canadense	BAG – FAL/UnB ³ – DF
90	Coquinho	
91	Rosada Prudente	
92	Rubissol	
93	Uruguaiiana	
94	Campo 1	Bonito – PE
95	Campo 1	Camaragibe – PE
96	Campo 1	Abreu e Lima – PE
97	Campo 1	Itapissuma – PE
98	Campo 1	Igarassu – PE
99	Cambrainha	Camaragibe – PE
100	Campo 1	Mamanguape – PB

¹ BAG-IPA: Banco Ativo de Germoplasma do Instituto Agrônômico de Pernambuco

² BAG-UFRPE: Banco Ativo de Germoplasma da Universidade Federal Rural de Pernambuco

³ BAG-FAL/UnB: Banco Ativo de Germoplasma da Fazenda Água Limpa, Universidade de Brasília

2.4 Extração e análise de carotenóides de batata-doce por *High Performance Liquid Chromatography* – HPLC

As atividades de extração e análise por HPLC de batata-doce foram realizadas no Laboratório de Melhoramento de Plantas da Embrapa Hortaliças (CNPH). Para extração dos carotenóides foram utilizadas 100 amostras de batata-doce oriundas de diferentes regiões do Brasil, seguindo o procedimento descrito por Rodriguez-Amaya (2001), como segue: as amostras foram cortadas e pesadas 10 g, depois foram colocados em recipiente de vidro onde adicionou-se 40 mL de acetona-P.A, em seguida, o material foi triturado com auxílio de extrator

(Polytron, Kinematica) e filtrado a vácuo em funil de Büchner recolhido em kitassato, o extrato foi transferido para o funil de separação onde adicionou-se 40 mL de acetona e 40 mL de éter de petróleo (100 %), sendo os pigmentos transferidos da acetona para o éter de petróleo através da adição de pequenas frações de água destilada, descartando-se a fase inferior até a total remoção da acetona, transferindo-se a solução dos pigmentos em éter de petróleo para um balão volumétrico de 50 mL, passando por um filtro contendo sulfato de sódio, como material higroscópico sobre um filtro de lã de vidro, para retirada do excesso de água do material **(Figura 3)** retirando-se alíquotas para leitura da absorbância em espectrofotômetro UV - visível a 450 nm, após a leitura cada amostra foi devolvida ao balão volumétrico para a evaporação do éter em evaporador rotatório a 30 °C por 30 minutos, concluído esse procedimento iniciou-se a análise via HPLC onde os carotenóides foram re-dissolvidos em 2 mL de acetona grau HPLC (2 %), seguida de filtragem em filtro hidrofóbico (Millex – FH – Millipore, polytetrafluoretileno- PTFE, 0,45 mm), com auxílio de uma seringa de vidro. As condições do HPLC, foram fluxo de 0,8 mL/min, com fase móvel de 80 % de acetonitrila, 10 % de metanol e 10 % de acetato de etila, sendo a fase estacionária de uma coluna C-18 da Watters, e o tempo de corrida foi de 35 minutos para cada amostra.

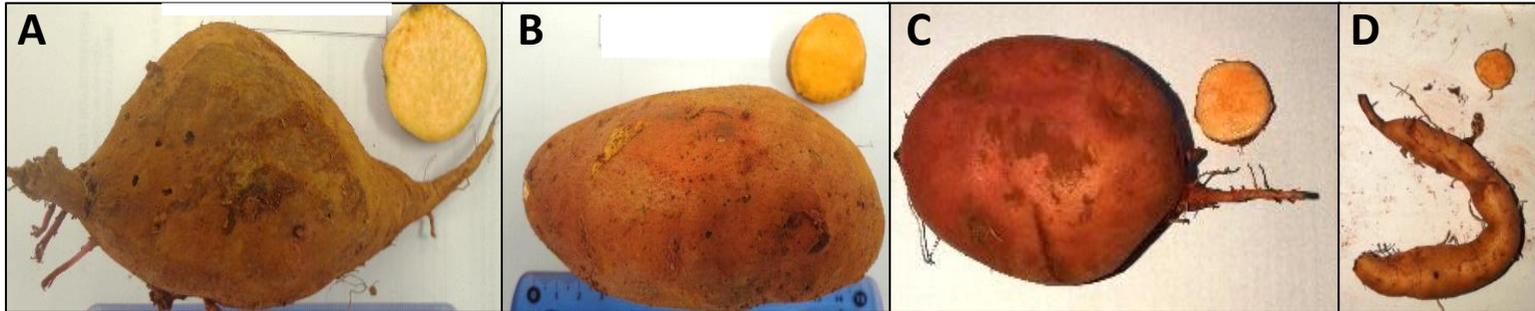


Figura 2. Raízes tuberosas de batata-doce (*Ipomoea batatas*). **A** - Cultivar Amélia e **B** - Cultivar Beauregard, ambas provenientes do Banco Ativo de Germoplasma da Fazenda Água Limpa/Universidade de Brasília (BAG-FAL/UnB) da Universidade de Brasília (UnB); **C** - Cultivar CR-06 e **D** - Cultivar Pérola ambas provenientes do Banco Ativo de Germoplasma de Universidade Federal Rural de Pernambuco (BAG/UFRPE).



Figura 3. Sequência de atividades preparativas para análise por *High Performance Liquid Chromatography* – HPLC em amostras de batata-doce (*Ipomoea batatas*). **A** - Plantio de ramos de batata-doce em campo da Estação Experimental de Biologia da Universidade de Brasília (EEB-UnB); **B** - Seleção, limpeza e pesagem das raízes colhidas; **C** - Tecido da raiz triturado e homogeneizado; **D** - Extração dos carotenóides em acetona; **E** - Solução dos pigmentos em éter de petróleo transferida para um balão volumétrico; **F** - Filtragem das amostras para leitura; **G** - Amostras organizadas em suporte para leitura de carotenóides em cromatógrafo e **H** - Cromatógrafo (LC-20A Prominence). (Fotos: Caroline Souza).

2.5 Cultura de tecidos e recuperação de plantas de batata-doce livres de vírus

Com a finalidade de realizar limpeza clonal de batata-doce foram escolhidas as plantas de que apresentaram maiores teores de beta-caroteno como fonte de explantes, das quais utilizou-se 3 cm dos ápices caulinares de cada planta foram retirados com 10 repetições, sendo estes mantidos em câmara úmida até o momento da excisão do meristema apical. Os explantes foram lavados em água corrente e a desinfestação foi realizada em solução de: 70 mL de água destilada, 30 mL de solução comercial de hipoclorito de sódio a 2.5% (0,5% de cloro ativo) com três gotas de Tween-20 por 15 minutos e em seguida lavadas com água autoclavada por três vezes, após esse procedimento, meristemas com um primórdio foliar foram excisados das gemas e colocados individualmente, em frascos contendo meio MS, o procedimento foi realizado em câmara de fluxo laminar. O meio básico de cultivo foi preparado de acordo com Murashige & Skoog (1962), tendo sido adicionadas, combinações de ácido giberélico a 0,0; 1,45; 2,9 e 5,8 mM e cinetina a 0,0; 2,3; 4,6 e 9,3 mM. O pH do meio foi ajustado para 5,0. O meio foi distribuído em quantidade de 3 mL por frasco de base quadrada de dimensões 35 x 35 mm e altura 65 mm, que foram fechados com tampas de polipropileno e autoclavados a 120 °C e $1,05 \times 10^5$ KPa, durante 15 minutos. Os frascos com os explantes foram mantidos, sob agitação orbital contínua de 0,175g (125 rpm, raio 10 mm), em câmara de crescimento, com densidade de fluxo de fótons fotossinteticamente ativos de $64 \text{ mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, fotoperíodo de 16 horas e temperatura de 27°C, sendo realizada a avaliação após 60 dias de inoculação por meio da determinação do número de plantas regeneradas por tratamento. As plântulas regeneradas foram transferidas para 10 tubos de ensaio sendo 1 explante por tubo contendo meio MS sólido. Após 30 dias, as plântulas foram transferidas para vasos contendo substrato, os quais foram mantidos isolados em caixas de madeira com as laterais em vidro evitando-se o contato com possíveis insetos vetores, até que fossem realizados os testes de indexação (**Figura 4**).



Figura 4. Esquema do processo de limpeza clonal e regeneração das plantas de batata-doce (*Ipomoea batatas*). **A a D** - Amostras de batata-doce selecionadas por *High Performance Liquid Chromatography* - HPLC: (**A**) Amélia, (**B**) Beaugard, (**C**) CR-06 e (**D**) Pérola, **E** - Ápices caulinares das plantas selecionadas, **F** - Esterilização dos ápices em hipoclorito de sódio, **G** - Retirada dos meristemas sob lupa, **H** - Meristemas no meio de cultura M&S líquido para crescimento, **I** - Plântulas regeneradas após 60 dias em meio líquido, **J** - Transferência das plântulas para meio M&S sólido, **K** - Tubos de ensaio com meio sólido para desenvolvimento das plântulas, **L** - Amostra regenerada (pérola) após 30 dias em substrato, **M** - Amostras de batata-doce regeneradas: plantas mantidas em caixas isoladas para aclimação: **N** - Amélia, **O** - Pérola e **P** - CR-06.

2.6 Indexação das plantas regeneradas

As plantas aqui analisadas foram indexadas para as espécies detectadas no sequenciamento:

Sweet potato feathery mottle virus (SPFMV), *Sweet potato virus G* (SPVG), *Sweet potato virus C* (SPVC) (família *Potyviridae*, gênero *Potyvirus*), *Sweet potato mild mottle virus* (SPMMV)

(família *Potyviridae*, gênero *Ipomovirus*), *Sweet potato chlorotic stunt virus* (SPCSV) (família *Closteroviridae*, gênero *Crinivirus*), *Sweet potato leaf curl virus* (SPLCV) (família *Geminiviridae*, gênero *Begomovirus*) e *Sweet potato symptomless mastrevirus 1* (SPSMV-1) (família *Geminiviridae*, gênero *Mastrevirus*).

Após uma semana de aclimação, foi coletada uma folha de cada planta de batata-doce regenerada para realização de extração de RNA com utilização de RNeasy Mini Kit – Qiagen, seguindo instruções do fabricante e DNA total pelo método CTAB (Cetyltrimethylammonium bromide). Os *primers* utilizados estão representados nas **Tabela 2 e 3**.

Tabela 2. *Primers* desenhados com base nas sequências obtidas no sequenciamento *Illumina* de amostras de batata-doce (*Ipomoea batatas*) para detecção de três espécies de *Potyvirus* e uma de *Crinivirus*

Espécie/Gênero	Nome_Posição ^{/1}	Sequência 5' - 3'	Ta °C ^{/2}	Fragmento (pb)	Região do genoma
<i>Sweet potato feathery mottle virus</i> (SPFMV)/ <i>Potyvirus</i>	SPFMV_9.534F	CTGATCCAGAGGACCCGAAG	58	1.070	CP ^{/3}
	SPFMV_10.604R	CGATCACGAACCAAAAAGGC			
<i>Sweet potato virus C</i> (SPVC)/ <i>Potyvirus</i>	SPVC_1.654F	GACGCCTTCTATGAAGCGGA	60	408	P1(PISPO) ^{/4}
	SPVC_2.061R	GCTAAAGCCCCACGAACCA			
<i>Sweet potato virus G</i> (SPVG)/ <i>Potyvirus</i>	SPVG_9.490F	CAACGTGTATCATCAGTCTGC	58	1.066	CP
	SPVG_10.556R	AAATTACTGAAGGCGAAACTGA			
<i>Sweet potato chlorotic stunt virus</i> (SPCSV)/ <i>Crinivirus</i>	RNA2_4.359F	ATGGCCGATAGTAACAAAACAG	54	773	CP
	RNA2_5.132R	CGATCACGAACCAAAAAGGC			

^{/1} Nome do *primer* e posição do nucleotídeo na sequência do genoma

^{/2} Ta: Temperatura de anelamento do *primer*

^{/3} CP: Coat protein

*PISPO: Pretty Interesting Sweet Potato Potyvirus ORF

Tabela 3. Primers utilizados para detecção de espécies virais dos gêneros *Ipomovirus*, *Begomovirus*, *Cavemovirus* e *Mastrevirus*

Espécie/Gênero	Nome Primer	Sequência 5' -3'	Ta °/1C	Fragmento (pb)	Região do genoma*	Referência
<i>Sweet potato mild mottle virus</i> (SPMMV)/ <i>Ipomovirus</i>	MPIpF	GGBAAYAAYAGYGGDCARCC	56	1.400	NIB ²	Rukarwa <i>et al.</i> , 2010
	MPIpR	TTGAGCTCCTCTCAGACT				
<i>Sweet potato leaf curl virus</i> (SPLCV)/ <i>Begomovirus</i>	MA292	CCYTAGGGTTCGAGCTVTGTTCGG	48	823	CP ³	Lozano <i>et al.</i> , 2009
	MA293	TTTATTAATTDTRTGC GAATC				
<i>Sweet potato symptomless mastrevirus 1</i> (SPSMV-1)/ <i>Mastrevirus</i>	SPSMV1_F	CCTAAGTCGTCGTCCGATAG	64	417	MP ⁴ /CP	Cao <i>et al.</i> , 2017
	SPSMV1_R	TTGAGTCCAGGTAAACTGAGC				
<i>Sweet potato vein clearing virus</i> (SPVVCV)/ <i>Cavemovirus</i>	cavV_F	TGAATGCAAAGACAAAAACCTA	55	373	RT ⁵ domain	Cuellar <i>et al.</i> , 2011
	cavV_R	GATAAACTAACTCCTGCTTCTT				
<i>Sweet potato caulimo-like virus</i> (SPCV)/ <i>Cavemovirus</i>	cav_F	AGGAAATCCCAGTATTATTCAAC	55	927	RT domain	De Souza & Cuellar, 2011
	cav_R	ATTTCTAATTTGGTTTACTAATCC				

¹ Ta°: Temperatura de anelamento

² NIB: nuclear inclusion body

³ CP: coat protein

⁴ MP: movement protein

⁵ RT domain: reverse transcriptase domain

3. RESULTADOS

3.1 Análise de beta-caroteno

Analisando os resultados de beta-caroteno, foi possível determinar que das 100 amostras avaliadas, somente quatro apresentaram elevado teor de beta-caroteno pela análise por HPLC: Amélia, Beauregard, CR-06 e Pérola com 0,75 µg/g, 0,76 µg/g, 0,73 µg/g e 0,67 µg/g respectivamente (**Figuras 5 a 8**), correspondendo a 4% das amostras avaliadas (**Tabela 3**).

Com a limpeza clonal foi possível regenerar três das quatro plantas utilizadas: Amélia, CR-06 e Pérola, sendo 10 repetições de cada uma das cultivares Amélia e CR-06 e duas repetições da cultivar Pérola.

Com a indexação das cultivares com maiores teores de beta-caroteno foi possível identificar as espécies SPLCV, SPSMV-1, SPFMV e SPVG em todas as amostras avaliadas. Enquanto que para as espécies SPVCV, SPCV, SPVC, SPMMV e SPCSV não houve detecção por PCR (**Tabela 4**).

Tabela 4. Avaliação de cultivares de batata-doce (*Ipomoea batatas*) utilizadas para colorimetria e quantificação de carotenoides totais e beta-caroteno por meio de cromatografia por HPLC

Nº	Cultivar	Local de coleta	Cor da polpa	Carotenóides totais µg/g	Beta-caroteno µg/100g
1	Batateira	Itapissuma – PE	Branca	0.32	0.16
2	Batateira	Goiana – PE	Branca	0.46	0.29
3	Vitória	Nazaré da Mata – PE	Bege	12.4	10.1
4	Ligeirinha	Pedra de Fogo – PB	Branca	0.56	0.48
5	Batata Roxa	Paudalho – PE	Bege	15.7	11.3
6	Princesa		Bege	14.9	11.9
7	Granfina	Itambé – PE	Branca	0.76	0.51
8	Parece		Branca	0.98	0.72
9	Paulistinha		Branca	1.02	0.88
10	Muciliana		Amarela	17.8	14.3
11	Granfina do Talo Roxo	Goiana – PE	Bege	16.9	13.4
12	Acesso nº 1202	BAG – IPA ¹ – PE	Bege	17.1	12.5
13	Acesso nº 1219		Branca	0.60	0.34
14	Acesso nº 1007		Branca	0.72	0.47
15	Acesso nº 1189		Amarela	12.6	10.0
16	Acesso nº 1213		Amarela	30.5	21.6
17	CO Roxa		Amarela	15.5	11.8
18	Pé de Pombo	São Joaquim do Monte – PE	Branca	0.76	0.57
19	Branquinha		Bege	17.0	13.7
20	Branquinha		Bege	18.9	15.6
21	Branquinha	Belém de Maria – PE	Amarela	24.3	20.7
22	Pé de Pombo		Bege	19.8	15.8

23	Pé de Pombo	Camocim de São Félix – PE	Bege	17.9	11.9
24	Branca		Branca	0.32	0.12
25	Orelha de Burro		Bege	19.2	15.6
26	Angico		Bege	18.8	13.8
27	Agrestina		Bege	18.1	14.5
28	Balão roxo		Amarela	19.0	16.2
29	Branca do talo roxo		Bege	22.3	18.1
30	Branca de Altinho		Bege	21.0	17.3
31	Bom Nome		Bege	14.7	9.9
32	Carpinteira		Bege	13.4	8.7
33	Centenial		Branca	0.53	0.29
34	CR-06		Laranja	97.8	73.3
35	Coroatã		Branca	0.65	0.29
36	Eucalipto		Branca	0.62	0.33
37	Granfina	BAG – UFRPE ² -PE	Amarela	17.7	14.5
38	Grossa da Paz		Branca	1.05	0.89
39	L7-Bege		Branca	0.57	0.28
40	Mãe de família		Branca	0.89	0.51
41	Mineira		Branca	0.97	0.64
42	Olho de urubu		Bege	8.2	5.7
43	Pérola		Laranja	101.7	67.2
44	Pedra		Branca	1.33	0.78
45	Pincel		Bege	6.43	5.12
46	Rabo de Boi		Bege	3.42	1.98
47	RC-03		Branca	0.66	0.19
48	Talo Roxo		Bege	5.27	3.4
49	UFRPE-1.88		Bege	5.06	4.01

50	Var. J.G.Pierre		Bege	4.8	2.4
51	Vitorinha		Branca	0.86	0.57
52	010-CNPH		Branca	0.62	0.43
53	1RN		Bege	17.6	13.6
54	2RN		Bege	16.6	12.2
55	4RN		Branca	0.99	0.74
56	6RN		Branca	0.46	0.34
57	7RN	Rio Grande do Norte	Branca	0.59	0.44
58	8RN		Branca	1.65	1.23
59	9RN		Branca	1.08	0.81
60	10RN		Branca	0.24	0.18
61	11RN		Branca	1.06	0.76
62	12RN		Branca	0.99	0.75
63	Princesa	Brazlândia – DF	Branca	0.96	0.72
64	Roxinha		Roxa	1.42	1.06
65	Brazlândia Rosada		Branca	1.97	1.47
66	Braz Rosada	Brasília – DF	Bege	4.19	3.15
67	Santa Sofia		Bege	6.18	4.6
68	29DF		Bege	2.02	1.52
69	Georgia Improved	Viçosa – MG	Branca	1.87	1.40
70	41DF	Brasília – DF	Branca	1.55	1.16
71	Balão	Manaus – AM	Branca	1.88	1.23
72	53DF	Brasília – DF	Bege	2.14	1.60
73	Rainha	Pompeu – MG	Branca	3.03	2.27
74	Batata Africana	Argentina – FAL	Branca	1.16	0.87
75	Batata Correntina	Brasília – DF	Branca	1.43	1.07
76	69DF		Branca	0.95	0.70

77	71RS	Não Me Toques – RS	Branca	1.16	0.87
78	80RS	Cangussu – RS	Amarela	3.46	2.6
79	87MS	Campo Grande – MS	Roxa	1.27	0.95
80	1796SC	Palmeira – SC	Roxa	5.06	3.8
81	Araçá	Paudalho – PE	Amarela	10	7.5
82	Não identificada	Camaragibe – PE	Branca	0.40	0.30
83	Não identificada	Vitória – PE	Amarela	5.3	3.97
84	Não identificada	Itamaracá – PE	Branca	1.54	1.15
85	Não identificada	Igarassu – PE	Branca	0.33	0.24
86	Amélia		Laranja	90.4	75.5
87	BRS Cuia		Branca	0.69	0.52
88	Beauregard		Laranja	121.6	76.1
89	Canadense	BAG – FAL ³ – DF	Branca	2.40	1.80
90	Coquinho		Branca	1.61	1.21
91	Rosada Prudente		Branca	2.66	1.99
92	Rubissol		Branca	1.01	0.76
93	Uruguaiana		Bege	6.44	4.8
94	Não identificada	Bonito – PE	Branca	1.25	0.93
95	Não identificada	Camaragibe – PE	Bege	0.32	0.24
96	Não identificada	Abreu e Lima – PE	Branca	1.87	0.78
97	Não identificada	Itapissuma – PE	Bege	6.89	5.02
98	Não identificada	Igarassu – PE	Bege	10.3	7.9
99	Cambraíha	Camaragibe – PE	Bege	6.8	5.14
100	Não identificada	Mamanguape – PB	Branca	0.97	0.68

¹ BAG-IPA: Banco Ativo de Germoplasma do Instituto Agrônomo de Pernambuco

² BAG-UFRPE: Banco Ativo de Germoplasma da Universidade Federal Rural de Pernambuco

³ BAG-FAL/UnB: Banco Ativo de Germoplasma da Fazenda Água Limpa, Universidade de Brasília

Com a análise dos dados da limpeza clonal após o estabelecimento das plantas confirmou-se que a espécie SPLCV foi detectada na amostra CR-06 (CR-06 - 9) e duas repetições da amostra Amélia (Amélia - 3 e 4) não foram positivas para este vírus. Para a espécie SPSMV-1, foram negativos uma repetição da amostra CR-06 (CR-06 - 9) e uma repetição da amostra Amélia (Amélia - 8). Para as outras espécies dos vírus: SPVCV, SPCV, SPFMV, SPVG, SPVC, SPMMV e SPCSV não houve reação positiva para nenhuma repetição (**Tabela 5**).

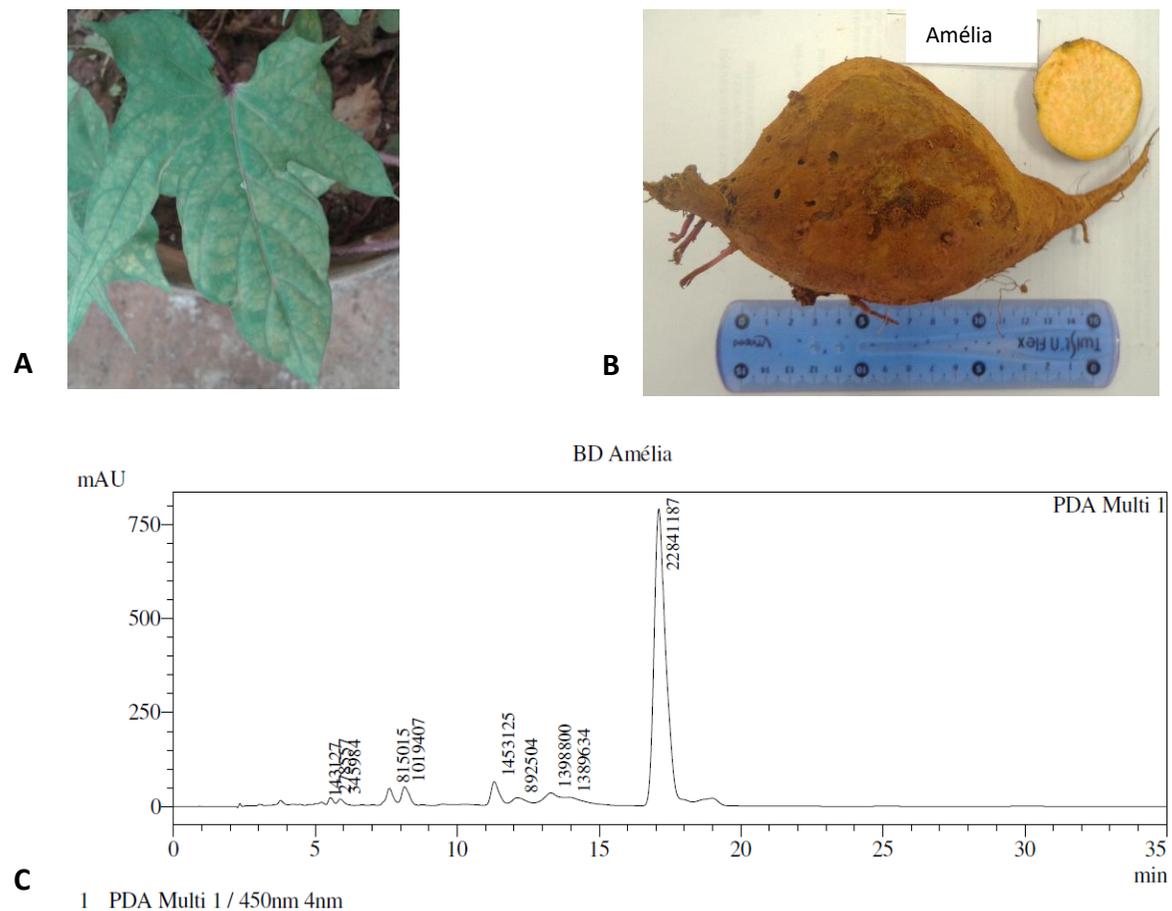


Figura 5. Cromatograma *High Performance Liquid Chromatography*-HPLC de carotenóides em extrato de batata-doce (*Ipomoea batatas*). **A** - Planta de batata-doce cv. Amélia proveniente do Banco Ativo de Germoplasma da Fazenda Água Limpa (BAG/FAL) da Universidade de Brasília (UnB); **B** - Raiz da batata-doce cv. Amélia após 120 de cultivo e **C** - Gráfico dos picos de carotenóides da cv. Amélia.

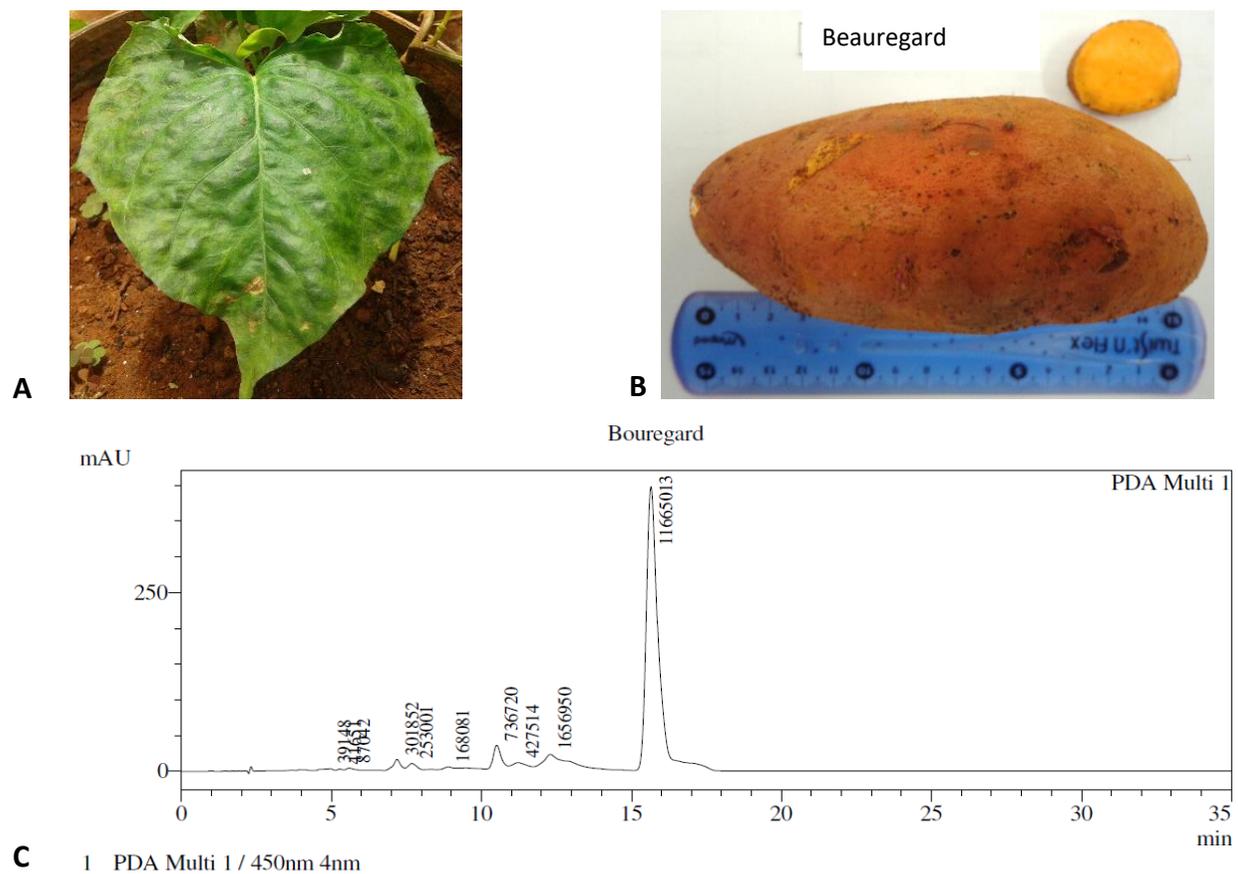


Figura 6. Cromatograma de *High Performance Liquid Chromatography* - HPLC de carotenóides em extrato de batata-doce (*Ipomoea batatas*). **A** - Planta de batata-doce cv. Beauregard proveniente do Banco Ativo de Germoplasma da Fazenda Água Limpa (BAG/FAL) da Universidade de Brasília (UnB); **B** - Raiz da batata-doce cv. Beauregard e **C** - Gráfico dos picos de carotenóides da cv. Beauregard.

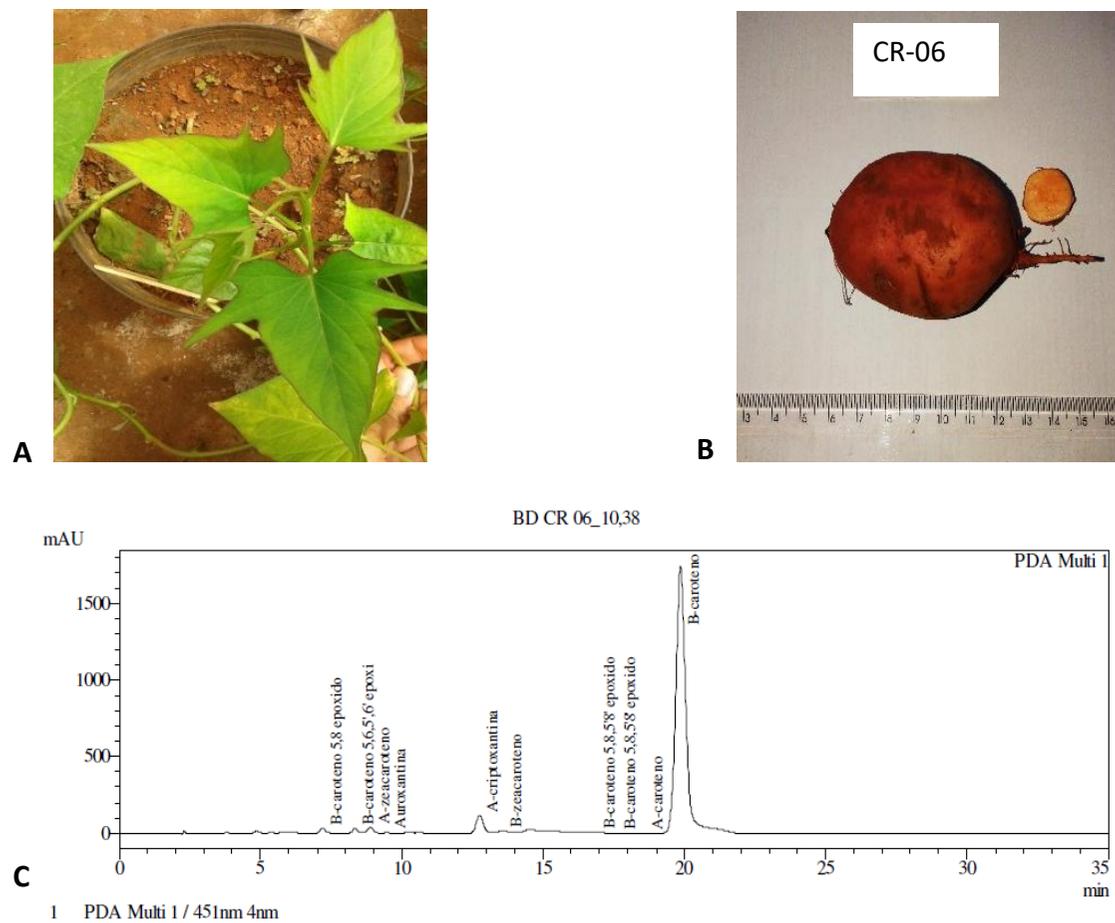


Figura 7. Cromatograma *High Performance Liquid Chromatography* - HPLC de carotenoides em extrato de batata-doce (*Ipomoea batatas*). **A** - Planta de batata-doce cv. CR-06 proveniente do Banco Ativo de Germoplasma de Universidade Federal Rural de Pernambuco (BAG/UFRPE); **B** - Raiz da batata-doce cv. CR-06 e **C** - Gráfico dos picos de carotenóides da cv. CR-06.

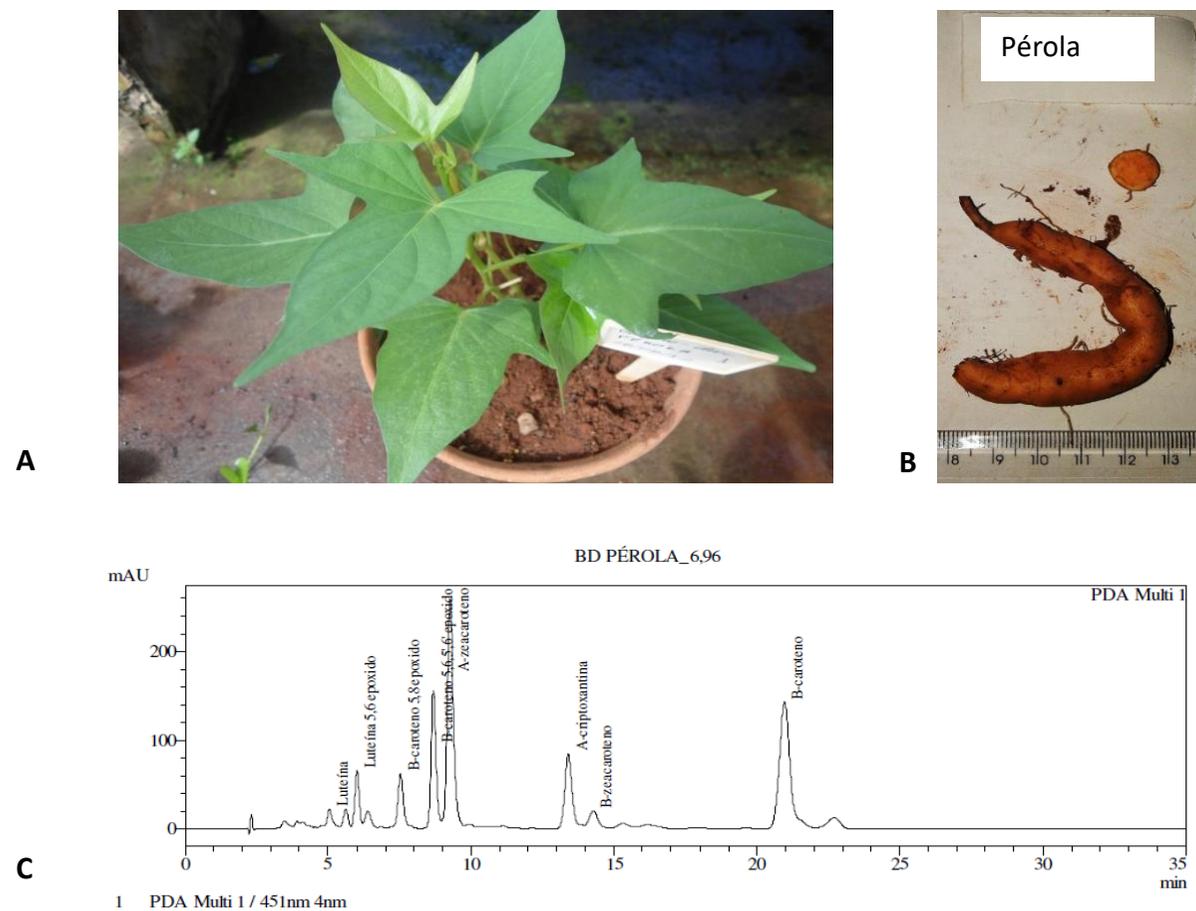


Figura 8. Cromatograma *High Performance Liquid Chromatography* - HPLC de carotenóides em extrato de batata-doce (*Ipomoea batatas*). **A** - Planta de batata-doce cv. Pérola proveniente do Banco Ativo de Germoplasma de Universidade Federal Rural de Pernambuco (BAG/UFRPE); **B** - Raiz da batata-doce cv Pérola e **C** - Gráfico dos picos de carotenóides da cv. Pérola.

Tabela 5. Amostras de batata-doce (*Ipomoea batatas*) avaliadas quanto a presença de espécies de vírus por PCR e RT-PCR, antes de proceder-se a limpeza clonal

Nº	Planta	Local	DNA		RNA				
			<i>Begomovirus</i>	<i>Mastrevirus</i>	<i>Potyvirus</i>			<i>Ipomovirus</i>	<i>Crinivirus</i>
			SPLCV ^{/4}	SPSMV1 ^{/5}	SPFMV ^{/6}	SPVG ^{/7}	SPVC ^{/8}	SPMMV ^{/9}	SPCSV ^{/10}
1	Amélia	BAG-FAL/UnB ^{/1} - DF	+ ^{/11}	+	+	+	- ^{/12}	-	-
2	Beauregard	FAL - RS ^{/2} BAG- UFRPE ^{/3} -	+	+	+	+	-	-	-
3	CR-06	PE	+	+	+	+	-	-	-
4	Pérola	BAG- UFRPE-PE	+	+	+	+	-	-	-

^{/1}BAG-FAL/UnB: Banco Ativo de Germoplasma-Fazenda Água Limpa/Universidade de Brasília; ^{/2}FAL-RS: Fazenda Água Limpa-Rio Grande do Sul; ^{/3}BAG-UFRPE: Banco Ativo de Germoplasma-Universidade Federal Rural de Pernambuco; ^{/4}SPLCV: *Sweet potato leaf curl virus*; ^{/5}SPSMV1: *Sweet potato symptomless mastrevirus 1*; ^{/6}SPFMV: *Sweet potato feathery mottle virus*; ^{/7}SPVG: *Sweet potato virus G*; ^{/8}SPVC: *Sweet potato virus C*; ^{/9}SPMMV: *Sweet potato mild mottle virus*; ^{/10}SPCSV: *Sweet potato chlorotic stunt virus*; ^{/11}(+): amostra positiva; ^{/12}(-): amostra negativa

Tabela 6. Avaliação de amostras de batata-doce (*Ipomoea batatas*) regeneradas e avaliadas quanto a presença de espécies de vírus

Número	Planta/ Repetição	DNA		RNA				
		<i>Begomovirus</i> SPLCV ¹	<i>Mastrevirus</i> SPSMV1 ²	<i>Potyvirus</i> SPFMV ³ SPVG ⁴		SPVC ⁵	<i>Ipomovirus</i> SPMMV ⁶	<i>Crinivirus</i> SPCSV ⁷
1	Pérola 1	+ ⁸	+	- ⁹	-	-	-	-
2	Pérola 2	+	+	-	-	-	-	-
3	CR-06 -1	+	+	-	-	-	-	-
4	CR-06 -2	+	+	-	-	-	-	-
5	CR-06 -3	+	+	-	-	-	-	-
6	CR-06 -4	+	+	-	-	-	-	-
7	CR-06 -5	+	+	-	-	-	-	-
8	CR-06 -6	+	+	-	-	-	-	-
9	CR-06 -7	+	+	-	-	-	-	-
10	CR-06 -8	+	+	-	-	-	-	-
11	CR-06 -9	-	-	-	-	-	-	-
12	CR-06 -10	+	+	-	-	-	-	-
13	Amélia -1	+	+	-	-	-	-	-
14	Amélia -2	+	+	-	-	-	-	-
15	Amélia -3	-	+	-	-	-	-	-
16	Amélia -4	-	+	-	-	-	-	-
17	Amélia -5	+	+	-	-	-	-	-
18	Amélia -6	+	+	-	-	-	-	-
19	Amélia -7	+	+	-	-	-	-	-
20	Amélia -8	+	-	-	-	-	-	-
21	Amélia -9	+	+	-	-	-	-	-
22	Amélia -10	+	+	-	-	-	-	-

¹SPLCV: *Sweet potato leaf curl virus*; ²SPSMV1: *Sweet potato symptomless mastrevirus 1*; ³SPFMV: *Sweet potato feathery mottle virus*; ⁴SPVG: *Sweet potato virus G*; ⁵SPVC: *Sweet potato virus C*; ⁶SPMMV: *Sweet potato mild mottle virus*; ⁷SPCSV: *Sweet potato chlorotic stunt virus*; ⁸(+): amostra positiva; ⁹(-): amostra negativa

4. DISCUSSÃO

No Brasil, a cultura da batata-doce tem significativa importância, e vem sendo uma das hortaliças mais consumidas e adaptadas a todas as regiões do País (Siciliano *et al.*, 2011). De fácil cultivo e de baixo custo de produção, as variedades atualmente cultivadas no País, são predominantemente de cor de polpa branca, amarela e creme (Melo *et al.*, 2011).

A coloração vermelha, laranja e amarela das frutas e vegetais é conferida por componentes como os carotenóides (Donado-Pestana *et al.*, 2012). Os carotenoides são alguns dos componentes presentes na polpa da batata-doce, além de fibras, minerais, vitaminas e antioxidantes, como ácidos fenólicos e antocianinas (Donado-Pestana *et al.*, 2012), estas características tem elevado o foco de pesquisa nos últimos anos em todo o mundo (Wang *et al.*, 2016).

Atualmente tem sido enfatizada a importância do beta-caroteno na batata-doce como fonte de vitamina A, sobretudo por se tratar de uma cultura de subsistência (Islam *et al.*, 2016). Utilizando-se análise por HPLC, esses autores avaliaram sete variedades de batata-doce em Bangladesh, sendo três com cor de polpa laranja, três variedades com polpa creme e uma variedade com polpa branca. Assim, também constataram que duas amostras de cor de polpa laranja tinham significativa quantidade de beta-caroteno e recomendam que estas variedades sejam usadas para combater a deficiência de vitamina A. Segundo Donado-Pestana *et al.* (2012), vem sendo desenvolvida no Brasil estratégias sobre a biofortificação da batata-doce de polpa laranja, como fonte de carotenóides para combater a deficiência de vitamina A. Esses autores conduziram um estudo, utilizando-se HPLC, para avaliar as concentrações de carotenóides individuais entre outros nutrientes, nas raízes de quatro cultivares de batata-doce biofortificadas.

Com intuito de aliar qualidade alimentar a maior rendimento/produção, no presente trabalho foi realizada limpeza clonal dos genótipos de batata-doce que apresentaram maiores índices de beta-caroteno.

Sabe-se que os patógenos mais detectados nos cultivos de batata-doce são os vírus e por serem facilmente transmitidos via multiplicação vegetativa, maneira mais usual de propagação da batata-doce, o aumento da incidência de plantas infectadas durante os sucessivos cultivos é recorrente, o que resulta na degenerescência do cultivo (Fernandes & Dusi, 2013).

Pozzer *et al.* (1994) utilizaram três cultivares de batata-doce: Brazlândia Branca, Brazlândia Roxa e Coquinho livres de vírus para avaliar a taxa de reinfecção pela espécie viral SPFMV em duas áreas diferentes, sendo uma previamente cultivada com batata-doce e outra sem cultivo prévio de batata-doce. Como resultado, Pozzer *et al.* (1994) encontraram diferença na progressão da taxa de reinfecção, sendo maior na área com prévio cultivo e não isolada em comparação à área isolada. A área a ser plantada com material proveniente de limpeza clonal deve apresentar condições que minimizem as reinfecções para que os ganhos em produtividade, obtidos de plantas livres de vírus, se mantenham com os cultivos sucessivos.

Amaro *et al.* (2014), realizaram limpeza clonal das seguintes cultivares: Brazlândia Branca, Brazlândia Rosada, Brazlândia Roxa, BRS Amélia, BRS Cuia, BRS Rubissol, Beauregard e Princesa, as quais também foram utilizadas e avaliaram diversas características agronômicas, tais como: número total de raízes, número de raízes com padrão comercial, produtividade total de raízes, produtividade de raízes com padrão comercial entre outras e verificaram a existência de diferenças significativas entre as cultivares, sobretudo na produtividade total de raízes em que se encontrou uma grande amplitude de variação indicando a existência de variabilidade genética entre os materiais avaliados para estes

caracteres, porém de forma geral as cultivares BRS Rubissol e BRS Amélia apresentaram melhor desempenho.

No presente trabalho a cultivar Beauregard não pode ser regenerada e segundo Flores *et al.* (2015) o sucesso da micropropagação pode ser influenciado pelo protocolo ou pelo meio nutritivo utilizado, além do genótipo ou cultivar em estudo. Sabe-se que a batata-doce apresenta alta variabilidade genotípica, mas ainda há poucos estudos nesse sentido (Oliveira *et al.*, 2008).

No presente trabalho, três cultivares apresentaram cor de polpa roxa: cv. Roxinha, 87MS e 1796RS. As batatas doces com polpas roxas contêm um alto teor de antocianinas comparável à de outras frutas e vegetais, como uvas, ameixas, cerejas doces, framboesas e berinjelas (Truong *et al.*, 2010). Kubow *et al.* (2016), estudaram a bioacessibilidade e biotransformação de antocianinas da batata-doce submetidos à digestão em um modelo gastrointestinal dinâmico que simula condições digestivas intestinais e encontraram variações na liberação de antocianinas durante os processos digestivos que podem estar relacionadas com cultivares ou outros componentes alimentares.

A partir da polpa de batata-doce ricas em beta-caroteno, é possível produzir farinha que pode ser incorporada em diversos alimentos para enriquecimento na alimentação humana (Nzamwita *et al.*, 2017).

Além disso, materiais isentos de vírus permitem a realização de testes envolvendo testes de caracterização molecular de vírus, dentre eles Postulados de Koch e estudo de gama de hospedeiras. Espécies de vírus novas ou relatadas pela primeira vez no Brasil, podem apresentar potencial de interagir com as demais espécies que já ocorrem na cultura e contribuir para a degenerescência viral. Com esse estudo foi possível a detecção em alta porcentagem de uma espécie de *Mastrevirus* em cultivares de batata-doce o que chama a atenção para a necessidade de análises adicionais de gama de hospedeiros e transmissão no

intuito de conhecer o potencial desta espécie que vem interagindo com as demais espécies de vírus presentes em batata-doce no País.

5. CONCLUSÕES

- Materiais ricos em beta-caroteno foram selecionados por meio de HPLC para as cultivares Amélia, Beauregard e CR-06 e Pérola.
- Materiais ricos em beta-caroteno e livres de vírus foram obtidos por meio de cultura de tecidos para a cultivar CR-06.

6. PERSPECTIVAS

- Realização de estudos futuros para recuperação do genoma completo de *Carlavirus*;
- Condução de estudos para completa caracterização molecular de SPSMV-1 (Postulados de Koch, gama de hospedeiras, estudos de transmissão e interação entre espécies virais).
- Os materiais ricos em beta-caroteno e livres de vírus poderão ser usados futuramente em programas de melhoramento genético de batata-doce.

7. LITERATURA CITADA

AMARO, G.B.; CARMONA, P.A.O.; FERNANDES, F.R.; SILVA, G.O. & PEIXOTO, J. R. 2014. Desempenho de cultivares de batata-doce a partir mudas de alta qualidade fitossanitária em Ceilândia-DF. Horticultura Brasileira 31: S2003- S2010.

AMARO, G.B.; FERNANDES, F.R.; SILVA, G.O.; MELLO, A.F.S. & CASTRO, L.A.S. 2017. Desempenho de cultivares de batata doce na região do Alto Paranaíba- MG. Horticultura Brasileira 35: 286-291.

BioFort. 2011. Disponível em: <<http://biofort.com.br/onde-estamos/>>. Acesso em: 01 de Mai. 2017.

BLOCK, G. 1994. Nutrient sources of provitamin A carotenóides in the American diet. American Journal of Epidemiology 139: 290-293.

CAO, M.; LAN, P.; LI, F.; ABAD, J.; ZHOU, C. & LI, R. 2017. Genome characterization of sweet potato symptomless virus 1: a mastrevirus with an unusual nonanucleotide sequence. Annotated Sequence Record. Archives of virology 162: 2881-2884.

CASTRO, L.A.S. 2015. Artigo: etanol de batata-doce, uma realidade. Disponível em: < <http://www.grupocultivar.com.br/noticias/artigo-etanol-de-batata-doce-uma-realidade>>. Acesso em: 24 de Abr. 2017.

CASTRO, L.A.S.; DUTRA, L.F. & BECKER, A. 2016. Produção de mudas de batata-doce. In: NASCIMENTO, W.M. & PEREIRA, R.B. Hortaliças de propagação vegetativa tecnologia de multiplicação. 1ª ed. Embrapa. Brasília. p. 100-127.

CASTRO, L.A.S.; ROCHA, N.E.M. & ABRANTES, V.L. 2008. Avaliação biológica de viroses em plantas matrizes e mudas de batata-doce (*Ipomoea batatas*). Circular Técnica 75: Embrapa Clima Temperado.

CUELLAR, W.J.; SOUZA, J.; BARRANTES, I.; FUENTES, S. & KREUZE, F. 2011. Distinct cavemoviruses interact synergistically with sweet potato chlorotic stunt virus (genus *Crinivirus*) in cultivated sweet potato. Journal of General Virology 92: 1233-1243.

DA SILVEIRA, L.R.; CHIESA, V.B.; TAVARES, I.B.; DE SOUZA, R.C.; DA SILVEIRA, M.A.; ALVES, D.G. & JUNIOR, W.P. De O. 2011. Caracterização físico-química e clones de batata-doce de polpa alaranjada nas condições de Palmas-TO. Estudos 38: 365-380.

DE SOUZA, J.; FUENTES, S.; SAVENKOV, E.I.; CUELLAR, W. & KREUZE, J.F. 2013. The complete nucleotide sequence of sweet potato C6 virus: a carlavirus lacking a cysteine-rich protein. Archives of Virology 158: 1393-1396.

DONADO-PESTANA, C.M.; SALGADO, J.M.; RIOS, A.O.; SANTOS, P.R. & JABLONSKI, A. 2012. Stability of Carotenoids, Total Phenolics and In Vitro Antioxidant Capacity in the Thermal Processing of Orange- Fleshed Sweet Potato (*Ipomoea batatas* Lam.) Cultivars Grown in Brazil. *Plant Foods for Human Nutrition* 67: 262-270.

FERNANDES, F.R. & DUSI, A.N. 2013. Viroses da batata-doce no Brasil: importância e principais medidas de controle. Circular Técnica: 126: 1-13.

FILGUEIRA, F.A.R. 2008. Novo manual de olericultura: agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças. Viçosa: UFV. 421p.

Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2014. FAOSTAT database. Disponível em: < <http://faostat.fao.org/>>. Acesso em: 01 de Mai. 2017.

FLORES, R.; MAGGIO, L.P.; FLÔRES, P.Z.; BEMPCK, G.S.; AULER, N.M.F.; CARVALHO, J.F.C.; GODOI, R.S.; FRANZIN, S.M.; BECKER, L. & SILVEIRA, T.M. 2015. Otimização da produção de plantas *in vitro* de cultivares de *Ipomoea batatas*. Revista de Ciências Agrárias 38: 429-437.

GRAEBNER, I.T.; SIQUEIRA, E.M.A.; ARRUDA, S.F. & SOUZA E.M.T. 2004. Carotenoids from native Brazilian dark-green vegetables are bioavailable: a study in rats. Nutrition Research 24: 671-679.

HORST, M.A. & MORENO, F.S. 2009. Funções Plenamente Reconhecidas de Nutrientes-Carotenóides. International Life Sciences Institute 6: 1-32.

INTERNATIONAL POTATO CENTER. Sweet potato. 2015. Disponível em:<<http://cipotato.org/sweetpotato>>. Acesso em: 13 de Set. 2017.

ISLAM, S.N.; NUSRAT, T.; BEGUM, P. & AHSN, M. 2016. Carotenoids and b-carotene in orange fleshed sweet potato: A possible solution to vitamin A deficiency. Food Chemistry 199: 628-631.

KHACHIK, F.; ENGLERT, G.; BEECHER, G.R. & SMITH, J. C. JR. 1995. "Isolation, structural elucidation, and partial synthesis of lutein dehydration products in extracts from human plasma". Journal of chromatography B 670: 219-233.

KREUZE, J. & FUENTES, S. Sweetpotato Viruses. Encyclopedia of Virology. 3ed. 2008. p.659-669

KUBOW, S.; ISKANDAR, M.M.; SABALLY, K.; AZADI, B.; SADEGHI-EKBATAN, S.; KUMARATHASAN, P. & ZUM-FELDE, T. 2016. Biotransformation of anthocyanins from two purple-fleshed sweet potato accessions in a dynamic gastrointestinal system. Food Chemistry 192: 171-177.

LOZANO, G.; TRENADO, H.P.; VALVERDE, R.A. & NAVAS-CASTILLO, J. 2009. Novel begomovirus species of recombinant nature in sweet potato (*Ipomoea batatas*) and *Ipomoea indica*: taxonomic and phylogenetic implications. Journal of General Virology 90: 2550-2562.

MELO, W.F.; GOMES, L.M.; MOITA, A.W.; AMARO, G.B.; BESSA, F.P. & DUSI, A.N. 2011. Biofortificação no Brasil (BioFort): Avaliação preliminar de clones de batata-doce ricos em betacaroteno. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE OLERICULTURA, Viçosa: ABH. 2675-2680.

MURASHIGE, T. & SKOOG, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum 15: 473-497.

NZAMWITA, M.; DUODU, K.G. & MINNAAR, A. 2017. Stability of b-carotene during baking of orange-fleshed sweet potato-wheat composite bread and estimated contribution to vitamin A requirements. Food Chemistry 228: 85-90.

OLIVEIRA, M.K.T.; NETO, F.B.; CÂMARA, F.A.; DOMBROSKI, J.L.D. & FREITAS, R.M. O. 2008. Multiplicação in vitro de batata-doce (*Ipomoea batatas* Lam). Revista Caatinga 21: 129-134.

PIO-RIBEIRO, G.; MARIANO, R.L.R.; PEREIRA-CARVALHO, R.C.; SOUZA, E.B.; MELO FILHO, P.A. 2016. Doenças da batata-doce. In: AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A. & CAMARGO, L.E.A. Manual de Fitopatologia – Doenças das plantas cultivadas. 5ª ed. Ceres. Ouro Preto. p. 149-158.

POZZER, L.; SILVA, J.B.C. & DUSI, A.N. 1992. Avaliação de perdas por virose no cultivo da batata-doce. Horticultura Brasileira, Brasília 10: 65.

POZZER, L.; SILVA, J.B.C.; DUSI, A.N. & KITAJIMA, E.W. 1994. Avaliação da taxa de reinfecção de plantas de batata-doce livre de vírus pelo *Sweet potato feathery mottle virus* em condições de campo. *Fitopatologia Brasileira* 19: 231-234.

RAO, A.V. & RAO, L.G. 2007. Carotenoids and human health. *Pharmacological Research* 55: 207-16.

REUHS, B.L. 2017. High-Performance Liquid Chromatography. *Food Analysis* pp 213-226.

RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. 2001. A guide to Carotenoid Analysis in Foods. ILSI PRESS.

RODRIGUEZ-AMAYA, D.B.; KIMURA, M. & AMAYA-FARFAN, J. 2008. Fontes brasileiras de carotenoides. Tabela Brasileira de Composição de Carotenóides em Alimentos. 2ª ed. Ministério do Meio Ambiente. Brasília.

RÓS, A.B.; HIRATA, A.C.S. & SANTOS H.S. 2012. Avaliação da produtividade de plantas de batata-doce oriundas de matrizes livres de vírus. *Revista Brasileira de Ciências Agrárias* 7:434-439.

RUKARWA, R.J.; MASHINGAIDZE, A.B.; KYAMANYWA, S. & MUKASA, S.B. 2010. Detection and elimination of sweet potato viruses. *African Crop Science Journal* 18: 223-233.

SCHULTZ, A.R. 1968. Introdução ao estudo da botânica sistemática. 3 ed.. Porto Alegre; Globo, v.2.

SHEKHAR, S.; MISHRA, D.; BURAGOHAIN, A.K. & CHAKRABORTY, S. & CHAKRABORTY, N. 2015. Comparative analysis of phytochemicals and nutrient availability in two contrasting cultivars of sweet potato (*Ipomoea batatas* L.). *Food Chemistry* 173: 957-965.

SICILIANO, I.; MORO, T.M.A.; SILVA, C.C.O.; MOURA, L.S.M.; PACHECO, S.; CARVALHO, J.L.V.; NUTTI, M.R. & GODOY, R.L.O. 2011. Teor de carotenoides em massa alimentícia à base de arroz e farinha de batata-doce de polpa alaranjada. IV Reunião de Biofortificação. Teresina, Piauí, Brasil. 4p.

SOUZA, A.B. 2000. Avaliação de cultivares de batata doce quanto atributos agronômicos desejáveis. *Ciência Agrotécnica* 24: 841-845.

SUN, H.; UM, T.; XI.; ZHANG, M. & CHEN, J. 2014. Sweet potato (*Ipomoea batatas* L.) leaves as nutritional and functional foods. *Food Chemistry* 156: 380-389.

TANG, G. 2010. Bioconversion of dietary provitamin A carotenoids to vitamin A in humans. *The American Journal of Clinical Nutrition* 91: 1468-1473.

TORRES, A.C.; TEIXEIRA, S.L. & POZZER, L. 1998. Cultura de ápices caulinares e recuperação de plantas livres de vírus. In: TORES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. Cultura de tecidos e transformação genética de plantas 1: 133-145.

TRUONG, V.; DEIGHTON, N.; THOMPSON, R.T.; MCFEETERS, R.F.; DEAN, L.O.; PECOTA, K.V. & YENCHO, G.C. 2010. Characterization of anthocyanins and anthocyanidins in purple-fleshed sweetpotato by HPLC-DAD/ESI-MS/MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58: 404-410.

UNTIVEROS, M.; FUENTES, S. & SALAZAR, L. F. 2007. Synergistic Interaction of Sweet potato chlorotic stunt virus (*Crinivirus*) with Carla-, Cucumo-, Ipomo-, and Potyvirus Infecting Sweet Potato. *Plant Disease* 91: 669-676.

VARGAS, P.F.; GODOY, D.R.Z.; ALMEIDA, L.C.F. & CASTOLDI, R. 2017. Agronomic characterization of sweet potato accessions. *Comunicata Scientiae* 8: 116-125.

WANG, S.; NIE, S. & ZHU, F. 2016. Chemical constituents and health effects of sweet potato. *Food Research International* 89: 90-116.

ZHOU, D.; ZHANG, B.; CHEN, B. & CHEN, H. 2017. Effects of oligosaccharides on pasting, thermal and rheological properties of sweet potato starch. *Food Chemistry* 230: 516–523.

CONCLUSÕES GERAIS

CONCLUSÕES GERAIS

- As técnicas aqui utilizadas para detecção e identificação de espécies de vírus foram concluídas com sucesso.

ANEXOS



Anexo 1. Sequências do genoma completo de espécies do gênero *Potyvirus* e seus respectivos números de acesso no GenBank utilizadas na construção da árvore filogenética do genoma completo

Gênero	Espécie	Nº acesso-GenBank	
<i>Potyvirus</i>	<i>Potato virus Y - PVY</i>	FJ204166	
		KT069222	
		KF386013	
		KF386014	
		KP115608	
		KP115609	
		KP115610	
		KU511268	
		<i>Sweet potato feathery mottle virus - SPFMV</i>	AB439206
			AB465608
	AB509453		
	AB509454		
	D86371		
	NC_001841		
	FJ155666		
	KP729265		
	<i>Sweet potato latent virus - SPLV</i>	KP115611	
		KP115612	
		SKP115613	
		KP115614	
		KC443039	
		NC_020896	
		<i>Sweet potato virus 2 - SPV2</i>	KX017448
			KP115616
			KP115617
			KP115618
	KP115619		
KP115615			
KU511270			
JN613807			
KP729268			
NC_017970			
KX017447			
<i>Sweet potato virus C – SPVC</i>	KU877879		
	KP115620		
	KP115621		
	KP115622		
	KU511269		
	JX489166		
GU207957			

	NC_014742
	JQ824374
	NC_018093
	JN613806
	KM014814
<i>Sweet potato virus G –SPVG</i>	KM014815
	KP115623
	JN613805
	KP729269
	KF790759
	KX279878

Anexo 2. Sequências do gênero *Begomovirus* e seus respectivos números de acesso no GenBank utilizadas na construção da árvore filogenética do genoma completo

Gênero	Espécie	Nº acesso- GenBank
		NC_015324
		KT992056
		FJ969829
		FJ969830
		HQ393444
	Sweet potato golden vein associated virus - SPGVaV ¹	HQ393459
		HQ393454
		HQ393452
		HQ393457
		HQ393447
		HQ333143
		KF803170
<i>Begomovirus</i>	Sweet potato leaf curl Bengal virus – SPLCBV ¹	NC_013640
	<i>Sweet potato leaf curl Canary virus – SPLCCV</i>	NC_030700
	<i>Sweet potato leaf curl China virus – SPLCChV</i>	KX033440
	<i>Sweet potato leaf curl Georgia virus – SPLCGV</i>	NC_004640
	<i>Sweet potato leaf curl Henan virus – SPLCHV</i>	NC_021719
	<i>Sweet potato leaf curl Sao Paulo virus - SPLCSPV</i>	NC_025681
	<i>Sweet potato leaf curl Sichuan virus 1 - SPLCSV1</i>	KX033443
	<i>Sweet potato leaf curl Sichuan virus 2 - SPLCSV2</i>	KX033437
	<i>Sweet potato leaf curl South Carolina virus – SPLCSCV</i>	NC_015317
	<i>Sweet potato leaf curl Uganda virus – SPLCUV</i>	NC_014968
		AB433786
	<i>Sweet potato leaf curl virus – SPLCV</i>	KT992067
		KF697071

KF716172
JQ349087
FJ969832
KT099143
FJ969833
FJ969834
FJ969835
FJ969836
FJ969837
KT099145
KC253235
KC253237
HQ393462
HQ393463
HQ393464
HQ393465
HQ393470
HQ393466
HQ393467
HQ393468
HQ393469
HQ393461
HQ393456
KC253234
HQ393445
HQ393460
HQ393455
HQ393449
HQ393442
HQ393476
HQ393443
HQ393446
HQ393453
HQ393450
HQ393451
KC253238
KY270781

Sweet potato mosaic virus – SPMV

FJ969831
JQ621843
KX859239
NC_033334

Tomato chlorotic mottle virus – ToCMoV

NC_003664

¹Espécie tentativa submetida ao International Committee of Taxonomy of Virus (ICTV)

Anexo 3. Sequências do **genoma completo de espécies do gênero *Mastrevirus*** e seus respectivos números de acesso no GenBank utilizadas na construção da árvore filogenética do genoma completo

Gênero	Espécie	Nº acesso - GenBank
	<i>Axonopus compressus streak virus</i> - ACSV	KJ437671
	<i>Bromus catharticus striate mosaic virus</i> - BCSMV	HQ113104
	<i>Chickpea chlorosis Australia virus</i> - CCAV	JN989418
	<i>Chickpea chlorosis virus</i> - CCV	JN989427
	<i>Chickpea chlorotic dwarf virus</i> - CCDV	KT719389
	<i>Chickpea redleaf virus</i> - CRV	GU256532
	<i>Chickpea yellows mastrevirus</i> - CYMV	JN989439
	<i>Chloris striate mosaic virus</i> - CSMV	NC_001466
	<i>Digitaria ciliaris striate mosaic virus</i>	JQ948088
	<i>Digitaria didactyla striate mosaic virus</i>	HM122238
	<i>Digitaria streak virus</i> - DSV	NC_001478
	<i>Eragrostis minor streak virus</i> - EMSV	KM230032
	<i>Eragrostis streak virus</i> - ESV	EU244915
	<i>Maize streak Reunion virus</i> - MSRV	JQ624879
	<i>Maize streak virus</i> – MSV	X01633
	<i>Miscanthus streak virus</i> - MiSV	NC_003379
	<i>Oat dwarf virus</i> – ODV	KX533459
	<i>Panicum streak virus</i> – PSV	GQ415395
<i>Mastrevirus</i>	<i>Paspalum dilatatum striate mosaic virus</i> - PDSMV	JQ948085
	<i>Saccharum streak virus</i> - SSV	GQ273988
	<i>Sporobolus striate mosaic virus</i> - SSMV	JQ948051
	<i>Sugarcane streak Egypt virus</i> - SSEV	AF039528
	<i>Sugarcane streak Reunion virus</i> - SSRV	EU244916
	<i>Sugarcane streak virus</i> -SCSV	S64567
	<i>Sugarcane white streak virus</i> -SWSV	KJ187748
		KY565232
		KY565231
	Sweetpotato symptomless mastrevirus 1 - SPSMV-1 ¹	KY565235
		KY565233
		KY565236
		KY565234
	<i>Switchgrass mosaic-associated virus</i> - SMaV	KF806701
	<i>Tobacco yellow dwarf virus</i> - TYDV	KC172702
	<i>Tomato leaf curl virus</i> - TLCV	NC_003896
	<i>Urochloa streak virus</i> - USV	KJ437667
	<i>Wheat dwarf India virus</i> - WDIV	KJ028209
	<i>Wheat dwarf virus</i> – WDV	KU877924

¹Espécie tentativa submetida ao International Committee of Taxonomy of Virus (ICTV)

Anexo 4. Genome Announcements

Complete genome sequence of *Sweet potato feathery mottle virus* and *Sweet potato virus G* from Brazil

Caroline A. Souza¹; Maurício Rossato¹; Fernando L. Melo^{2#}; Rita C. Pereira-Carvalho¹

¹University of Brasilia, Department of Phytopathology, Plant Virology Area, 70910-900, Brasília-DF, ²University of Brasilia, Department of Cell Biology, 70910-900, Brasília-DF.

Running Title: Genome of SPFMV and SPVG from Brazil

#Address correspondence to Fernando Lucas Melo: flmelo@unb.br

In Brazil, *Potyvirus* species in sweet potatoes have been detected mostly by serology. Here, we detected and sequenced the full genome sequence of two potyvirus: *Sweet potato feathery mottle virus* (SPFMV) and *Sweet potato virus G* (SPVG).

The sweet potato (*Ipomoea batatas* Lam) (7) is a tuberous root (5), belonging to the Convolvulaceae family. Globally, sweet potato is the seventh most important food crop after rice, wheat, potatoes, maize and cassava, but in developing countries, it is the fifth most important food crop (3).

The sweet potato is host to several pathogens, among them viruses have great importance due to their synergism caused by viral complexes, which triggers a more aggressive disease with considerable damages to the culture (2,6). There are currently 35 viral species that have been reported infecting the sweet potato crop in the world (1). In Brazil, 11 virus species have been reported to infect the sweet potato, of which four are of the genus *Potyvirus* (family *Potyviridae*): *Sweet potato feathery mottle virus* (SPFMV), *Sweet potato latent virus* (SPLV), *Sweet potato mild speckling virus* (SPMSV) and *Sweet potato virus G* (SPVG) (2).

Here, 40 sweet potato plants from distinct producing regions in Brazil, were grafted on *Ipomoea setosa* and kept in a greenhouse at the Experimental Station of Biology in the University of Brasília (EEB-UnB). The virus enrichment process with semi-purification of particles was carried out using leaves of *I. setosa*. Samples were weighed individually, to 1 g of each plant, and then pooled, forming a sample composed of 10 plants (10 g). From the purified particles, RNA extraction was performed using Trizol reagent following manufacturer's instructions. The composite sample was sent for sequencing on the Illumina MiSeq platform at the Universidade Católica de Brasília (UCB).

The raw reads (6,862,788 million paired-end reads) were trimmed and *de novo* assembled using CLC Genomics Workbench version (version 8.0). The resulting contigs were compared to the viral RefSeq database available in Genbank using BLASTx (4) implemented in Geneious version 9.1.5 (4). The contigs related to *Sweet potato feathery mottle virus* (SPFMV) (84 contigs) and *Sweet potato virus G* (SPVG) (3 contigs) were selected and mapped against reference genomes. The resulting genome of SPFMV (10,810 nt in length) encodes one polyprotein (3493 aa) along with PISPO (654 aa) and PIPO (218 aa), with 97.08% nucleotide identity over the entire genome compared to the SPFMV reference (NC_001841). The SPVG genome sequence was 10,775 nt in length with 98.31% nucleotide identity compared to SPVG reference genome (NC_018093). The genome encodes the polyprotein (3,488 aa), PISPO (601) and PIPO (216). Phylogenetic analysis using complete genomes available in GenBank

confirmed that both isolates are related to viruses from Asia and South America. This is the first full genome sequence of SPFMV and SPVG from Brazil.

Nucleotide sequence accession numbers. The sequences were deposited in GenBank under accession numbers MF185715 (SPFMV) and MF185716 (SPVG).

References

1. Clark CA, Davis JA, Abad JA, Cuellar WJ, Fuentes S, Kreuze JF, Gibson RW, Mukasa SB, Tugume AK, Tairo FD, Valkonen JPT. 2012. Sweet potato Viruses: 15 Years of Progress on Understanding and Managing Complex Diseases. *Plant Disease* 96:168-185.
2. Fernandes FR, Dusi AN. 2013. Viroses da batata-doce no Brasil: importância e principais medidas de controle. *Circular Técnica*: 126
3. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Faostat 2013. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567#ancor>>. Acesso em: 13 de set. 2015.
4. Kearse M, Moir R, Wilson A, Stones-Havas S, Cheung M, Sturrock S, Buxton S, Cooper A, Markowitz S, Duran C, Thierer T, Ashton B, Mentjies P, Drummond A. 2012. Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analyses of sequences data. *Bionformatics* 28:1647-1649.
5. Martins-da-Silva RCV, Silva ASL, Fernandes MM, Margalho LF. 2014. Noções Morfológicas e Taxonômicas para Identificação Botânica. Brasília, DF : Embrapa, 111 p.
6. Pio-Ribeiro G, Mariano RLR, Pereira-Carvalho RC, Souza EB, Melo-Filho PA. 2016. Doenças da batata-doce, p 149-158. *In*: AMORIM L, REZENDE JAM, BERGAMIN-FILHO A, CAMARGO LEA. Manual de Fitopatologia: doenças das plantas cultivadas, 5th ed, vol 2. Editora Agronômica Ceres, Ouro Fino, MG.
7. Schultz AR. 1968. Introdução ao estudo da botânica sistemática. 3rd ed, vol 2. Editora Globo, Porto Alegre, RS.

Anexo 5. Plant Disease Note

First Report of Sweet potato symptomless mastrevirus 1 Infecting *Ipomoea batatas* in Brazil.

C. A. Souza, Dept. of Plant Pathology, UnB, Brasília–DF, Brazil; **M. Rossato**, Dept. of Plant Pathology, UnB, Brasília–DF, Brazil; **F. L. Melo**, Dept. of Cell Biology, UnB, Brasília–DF, Brazil; **L. S. Boiteux**, Embrapa Vegetable Crops (CNPV), Brasília–DF, Brazil; **R. C. Pereira-Carvalho**, Dept. of Plant Pathology, UnB, Brasília–DF, Brazil.

The sweet-potato [*Ipomoea batatas* L. (Lam.)] is the seventh crop most consumed in the world (Vargas et al., 2017). Mixed infections of disease-inducing as well as latent viruses may intensify symptoms and result in severe yield and quality losses in this vegetative propagated crop (Paprotka, et al. 2010). Therefore, early detection of novel viruses is of great importance for preemptive management of these pathogens in sweetpotatoes. Recently, the complete

genome of Sweet potato symptomless mastrevirus 1 (SPSMV1), a putative species of the genus *Mastrevirus* (*Geminiviridae* family) was characterized (Cao et al., 2017). To evaluate the occurrence of this virus in Brazil we performed a nationwide survey using PCR assays. A total of 100 sweet-potato leaf samples were collected across all production regions. Genomic DNA was extracted using a modified CTAB method. Samples were submitted to RCA (*Rolling Circle Amplification*) followed by PCR using SPSM1-specific primers (55F: 5'-CCTAAGTCGTCGTCGATAG-3' and 472R: 5'-TTGAGTCCAGGTAAACTGAGC- 3') designed to amplify a 417 bp fragment from the V1 (CP) and V2 (MP) partial region (Cao et al., 2017). Fifty samples out of 100 were positive for SPSM1, one sample from the North (Amazonas State), one from the Southeast (Minas Gerais), two from the South (Rio Grande do Sul), six from the Center-East (Federal District and Mato Grosso do Sul) and 40 from the Northeast region (Pernambuco, Rio Grande do Norte, and Paraíba States). The gel-purified PCR amplicons were sequenced and displayed 98% nucleotide identity with SPSM1 sequences deposited at GenBank database. Furthermore, the complete genome of one isolate (cv. Branquinha from Pernambuco State) was amplified with the primers 805F: 5'-TGGATATTAGTAAACCGGGTCA-3' and 804R: 5'-CACCATTCGACGTCACAA-3' (Cao et al, 2017), cloned into vector pGEM T-Easy and sequenced. The resulting sequence (MG680260) presented 99% nucleotide identity with the SPSM1 sequences (Cao et al. 2017). In order to confirm these results, the plant selected for genome amplification was grafted on *I. setosa* and after 60 days SPSM1 infection was confirmed by PCR. This is the first report of SPSMV1 infecting sweet-potatoes in Brazil. The detection of SPSMV1 in half of the analyzed samples indicates a broad geographic distribution of this viral species in the country. Further studies should be carried out to understand the interaction of SPSMV1 with other economically important viral species infecting sweet-potatoes in Brazil.

References:

Cao, M., et al., 2017. Arch. Virol. DOI 10.1007/s00705-017-3396-z.

Paprotka, T., et al. 2010. Virus Res.149: 224.

Vargas, P.F., et al. 2017. Com. Scient. 8: 116.