



**MIRELLY CAROLINE ALVES**

**IDENTIFICAÇÃO DE INFECÇÕES SIMPLES E  
MISTAS DE ESTIRPES DE *Potato virus Y* (PVY)  
EM CAMPOS PRODUTORES DE BATATA**

**LAVRAS – MG  
2016**

**Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca  
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).**

Alves, Mirelly Caroline.

Identificação de infecções simples e mistas de estirpes  
de *Potato virus Y* (PVY) em campos produtores de batata / Mirelly  
Caroline Alves. – Lavras : UFLA, 2016.

88 p. : il.

Dissertação (mestrado acadêmico)–Universidade Federal de  
Lavras, 2015.

Orientador(a): Antônia Dos Reis Figueira.

Bibliografia.

1. DAS e TAS ELISA. 2. RT-PCR multiplex. 3. Potyvirus. 4.  
PVY. 5. RT-qPCR. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

**MIRELLY CAROLINE ALVES**

**IDENTIFICAÇÃO DE INFECÇÕES SIMPLES E MISTAS DE ESTIRPES  
DE *Potato virus Y* (PVY) EM CAMPOS PRODUTORES DE BATATA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Vegetal, área de concentração em Biotecnologia Vegetal, para a obtenção do título de Mestre.

Orientadora

Dra. Antônia dos Reis Figueira

Coorientadora

Dra. Suellen B. F. Galvino-Costa

**LAVRAS – MG**

**2015**

**MIRELLY CAROLINE ALVES**

**IDENTIFICAÇÃO DE INFECÇÕES SIMPLES E MISTAS DE ESTIRPES  
DE *Potato virus Y* (PVY) EM CAMPOS PRODUTORES DE BATATA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Vegetal, área de concentração em Biotecnologia Vegetal, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 05 de agosto de 2015.

Dra. Suellen B. F. Galvino-Costa – UFLA

Dr. Douglas Rodríguez Martínez - Departamento de Pesquisa Aplicada

Driscoll's Strawberry Associates, México.

Dra. Antônia dos Reis Figueira

Orientadora

**LAVRAS – MG**

**2015**

À Deus por mais esta conquista.

**OFEREÇO**

Aos meus pais, *Antonio & Vanda*,  
por tornarem possível esta conquista.  
Aos queridos Regis e Marli (*in memoriam*),  
saudades eternas.

**DEDICO**

## **AGRADECIMENTOS**

À Deus, por me conceder o privilégio do despertar todas as manhãs, pelas bênçãos imerecidas e por conduzir cada passo dado me guiando e protegendo.

À Universidade Federal de Lavras e ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Vegetal, pela oportunidade de realizar o Mestrado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos.

À Profa. Dra. Antônia dos Reis Figueira, pela orientação, pelo desafio proposto neste trabalho e pela experiência obtida através desses anos de estudo.

À Dra. Suellen, pela coorientação e companhia durante as longas horas de trabalho, pela dedicação, paciência e ensinamentos.

Aos meus pais, Antônio e Vanda, que são a razão de todos os meus esforços em buscar ser cada dia melhor. Aos meus amados, meu reconhecimento por tudo que fizeram até hoje por mim, cada um à sua maneira, me mostrou o quanto eu devia ser forte. Também agradeço aos meus irmãos, Francielly e Thiago, que são extremamente especiais e queridos, a concretização de mais essa etapa é com certeza devido ao apoio de vocês.

Ao Jefferson, por estar presente em todos os momentos construindo o futuro ao meu lado, que Deus continue nos abençoando para que nossos planos se tornem realidade.

Ao vovô João e a vovó Glorinha, pelo amor dedicado nos mais simples gestos, sempre preocupados com meu bem-estar. São o exemplo de vida mais doce e lindo, vocês me inspiram todos os dias, obrigada por cuidar de toda a família e mantê-la sempre unida. Todo o carinho de ambos eu guardo no coração. Aos tios, tias, primos e primas, em especial Andresa e Ana Cláudia,

pelo carinho, amor e amizade, e por me aturarem nos momentos mais estressantes dessa jornada.

E não poderia me esquecer de agradecer a minha segunda família, Francisco, Suelba e Walisson, pelos inúmeros momentos de descontração e divertimento, principalmente agradeço a minha sogra Marli (*in memoriam*), por ter me acolhido tão gentilmente, será sempre um exemplo de dedicação, generosidade e altruísmo pra mim.

Aos amigos de laboratório, Priscilla, Roberto, Daniele, Kelly, Thaís e Elisângela, pela companhia durante o trabalho. As minhas amigas de infância Keren e Cristina, que mesmo distantes torcem por mim. Aos demais parentes e amigos não citados, mas que direta ou indiretamente participaram desta conquista, meus sinceros agradecimentos.

**“Deus nunca disse que a jornada seria fácil,  
mas Ele disse que a chegada  
valeria a pena.”  
(Max Lucado)**



## RESUMO

O *Potato virus Y* (PVY) é considerado o principal vírus com importância econômica para a bataticultura no Brasil. Um dos fatores responsáveis pelo aumento da diversidade de PVY são as infecções mistas de estirpes, que durante o processo de replicação viral podem gerar recombinantes mais bem adaptados às condições ambientais, com propriedades biológica, sorológicas e moleculares diversificadas. Neste trabalho, foram analisados 126 tubérculos e 39 folhas de plantas de batata infectadas com PVY, coletadas em campos comerciais localizados no sul de Minas Gerais. Inicialmente foram avaliados os sintomas apresentados pelas plantas provenientes dos tubérculos infectados e, em seguida, foram utilizadas as técnicas DAS e TAS-ELISA, RT-PCR multiplex e RT-qPCR para estimar a ocorrência e predominância de estirpes PVY, bem como a sua concentração nas plantas amostradas. Nas plantas originadas dos tubérculos infectados, os sintomas variaram de leve a severo, em todas as cultivares de batata, indicando uma provável variabilidade na época do ciclo em que foram infectadas. Do total de amostras submetidas ao teste sorológico TAS-ELISA, 46,1% mostrou comportamento sorológico compatível com estirpes pertencentes ao grupo de sorotipo O e 34,5% com o grupo N, enquanto que 23,9% foram positivas para infecções mistas e 5,5% não reagiram com nenhum dos antissoros monoclonais testados. Dentre estas, dez amostras apresentaram padrão sorológico não usual. No teste RT-PCR multiplex, as amostras com sorotipo O e N ao mesmo tempo, foram identificadas como portadoras de infecção mista com as estirpes PVY<sup>NTN</sup> e PVY<sup>N:O/N-Wi</sup>. As amostras com sorotipo O foram identificadas como PVY<sup>N:O/N-Wi</sup> e as amostras com sorotipo N foram identificadas como PVY<sup>NTN</sup>, exceto quando possuíam infecções mistas. Foram identificados 43,6% de PVY<sup>N:O/N-Wi</sup>, 37% de PVY<sup>NTN</sup> e 19,4% de infecções mistas. Foram selecionadas aleatoriamente para o teste de RT-qPCR 151 amostras. As concentrações da estirpe PVY<sup>NTN</sup> nas plantas com infecção mista, independentemente da sua origem, variaram de  $2,79 \times 10^7$  a  $2,79 \times 10^{10}$  cópias virais/ $\mu$ l, enquanto que as concentrações da estirpe PVY<sup>N:O/N-Wi</sup> foram menores, variando de  $2,41 \times 10^3$  a  $4,13 \times 10^6$  cópias virais/ $\mu$ l. Sessenta e um isolados, que apresentaram perfil típico do recombinante PVY<sup>NTN</sup> na RT-PCR multiplex e RT-qPCR. Quando submetidos à reação de RT-PCR para amplificação do PVY<sup>E</sup>, 43 deles foram positivos apresentando perfil característico dessa estirpe recombinante, embora 9 isolados tenham apresentado padrões atípicos para o recombinante PVY<sup>E</sup>. A diversidade dos isolados de PVY, bem como a ocorrência de infecções mistas encontrada neste trabalho, fornece um panorama epidemiológico desse patógeno no país.

Palavras-chave: DAS e TAS-ELISA. RT-PCR multiplex. *Potyvirus*. PVY. RT-qPCR.

## ABSTRACT

The *Potato virus Y* (PVY) is considered the main virus with economic importance to potato culture in Brazil. One of the factors responsible for the increasing PVY diversity are mixed infections of strains that, during the viral replication process, can generate recombinants better adapted to environmental conditions with diverse biological, serological and molecular properties. In this paper, 126 tubers and 39 potato plant leaves infected with PVY, collected in commercial fields located in southern Minas Gerais were analyzed. Initially it was assessed the symptoms exhibited by plants from infected tubers and then DAS and TAS-ELISA, multiplex RT-PCR and RT-qPCR techniques were used to assess the occurrence and prevalence of PVY strains as well as their concentration in the sampled plants. In the plants originated from infected tubers, the symptoms vary from mild to severe in all potato cultivars, indicating a probable variability in the time cycle in which they were infected. In the TAS-ELISA serological testing, 46.1% of the samples showed serological behavior compatible with strains belonging to the 'O' serotype group and 34.5% with the 'N' group, while 23.9% were positive for mixed infections and 5.5% did not react with any of the tested monoclonal antisera. Among these, ten samples showed unusual serological pattern. In the multiplex RT-PCR test, the samples with O and N serotypes at the same time were identified as having mixed infection with PVY<sup>NTN</sup> and PVY<sup>N:O/N-Wi</sup> strains. Samples with O serotype were identified as PVY<sup>N:O/N-Wi</sup> and the ones with N serotype, as PVY<sup>NTN</sup>, except when they had mixed infections. It was identified 43,6% of PVY<sup>N:O/N-Wi</sup>, 37% of PVY<sup>NTN</sup> and 19,4% of mixed infections. One hundred and fifty-one samples were randomly selected for the RT-qPCR testing. The concentrations of PVY<sup>NTN</sup> strain in plants with mixed infections, regardless of its origin, varied from  $2,79 \times 10^7$  to  $2,79 \times 10^{10}$  viral copies/ $\mu$ l, while the concentrations of PVY<sup>N:O/N-Wi</sup> were lower, ranging from  $2,41 \times 10^3$  to  $4,13 \times 10^6$  viral copies/ $\mu$ l. Sixty-one isolates showed typical profile of PVY<sup>NTN</sup> recombinant in RT-PCR multiplex and RT-qPCR. When subjected to RT-PCR for amplification of PVY<sup>E</sup>, 43 of them were positive, having a characteristic profile for this recombinant strain, although 9 isolates was also observed with atypical patterns for recombinant PVY<sup>E</sup>. The diversity of PVY isolates present in Brazilian fields of potatoes studied in this work, as well as the occurrence of mixed infections, provides a general epidemiological picture of this pathogen in the country.

Keywords: DAS and TAS-ELISA. RT-PCR multiplex. *Potyvirus*. PVY. RT-qPCR.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1 Padrões de sintomas apresentados pelas plantas de batata provenientes dos tubérculos plantados: A1) Controle negativo: Planta de batata sadia; A2 e A3) MO+: 609/5 e CMF92; A4) MO++: S4; A5, A6 e A7) Mo+++ : 610/35, CMF1 e 608/84; A8 e A9) MO+++/RF: 611/33, 608/63..... 42
- Figura 2 Padrão eletroforético encontrado entre os isolados analisados. M=marcador 100pb; 1) 619.1/3; 2) 618.1/18; 3) S8; 4)608/84; 5) 610/27; 6) S1; 7) CMF46; 8) 618.1/1; 9) 609/5; 10) CMF18; 11) S11; 12) 619.2/2; 13) 610/98; 14) CMF1; 15) 619.1/3; 16) 618.1/18; 17) S8; 18) 608/84; 19) 610/27; 20) S1; 21) 622.2/6; 22) CMF46; 23) CMF50; 24) CP PVY<sup>NTN</sup>=LUI-AGA; 25) CP PVY<sup>N:O/N:Wi</sup>=PED-AX; 26) CP (controle positivo) PVY<sup>E</sup>= AGA-MON; 27) CN (controle negativo) PVY<sup>E</sup>=batata sadia; 28) CN (controle negativo) PVY<sup>NTN</sup> e PVY<sup>N:O/N:Wi</sup>=batata sadia..... 60
- Gráfico 1 Perfil sorológico dos isolados de PVY analisados por TAS-ELISA..... 51
- Gráfico 2 Médias das absorbâncias obtidas no teste TAS-ELISA, das amostras provenientes de campos de batata localizados no município de Ouro Fino-MG, utilizando os anticorpos monoclonais 1F5 e SASA-N, MAb2 e SASA-O, capazes de detectar os sorotipos N e O, respectivamente. O valor representado em cada barra indica a somatória das absorbâncias obtidas com os respectivos antissoros..... 56
- Gráfico 3 Médias das absorbâncias obtidas no teste TAS-ELISA, das amostras provenientes de campos de batata localizados no município de São Gotardo - MG, utilizando os anticorpos monoclonais 1F5 e SASA-N, MAb2 e SASA-O, capazes de detectar os sorotipos N e O, respectivamente. O valor representado em cada barra indica a somatória das absorbâncias obtidas com os respectivos antissoros..... 56

- Gráfico 4 Médias das absorvâncias obtidas no teste TAS-ELISA, das amostras provenientes de campos de batata localizados no município de Maria da Fé e Cristina-MG, utilizando os anticorpos monoclonais 1F5 e SASA-N, MAb2 e SASA-O, capazes de detectar os sorotipos N e O, respectivamente. O valor representado em cada barra indica a somatória das absorvâncias obtidas com os respectivos antissoros..... 57
- Gráfico 5 Médias das absorvâncias obtidas no teste TAS-ELISA, das amostras provenientes de estabelecimentos revendedores de batata localizados no município de Lavras-MG, utilizando os anticorpos monoclonais 1F5 e SASA-N, MAb2 e SASA-O, capazes de detectar os sorotipos N e O, respectivamente. O valor representado em cada barra indica a somatória das absorvâncias obtidas com os respectivos antissoros..... 57
- Gráfico 6 Proporção dos grupos de PVY recombinantes analisados por RT-PCR Multiplex..... 59
- Gráfico 7 Quantificação versus Ct para os pontos da curva padrão de cada reação estirpe-específica da RT-qPCR. As diluições seriadas dos plasmídeos linearizados ( $10^2$  a  $10^{12}$ ) foram testadas em triplicatas e os slopes e coeficiente de variação da curva padrão foram calculados e estão expostos nos gráficos. A) Curva padrão para detecção da estirpe PVY<sup>NTN</sup>. B) Curva padrão para detecção da estirpe PVY<sup>NTN</sup> ..... 62

## LISTA DE TABELA

Tabela 1	Combinação de <i>primers</i> empregados para a detecção das diferentes estirpes de PVY por meio de RT-PCR multiplex ..... 34
Tabela 2	Sequência de nucleotídeos dos <i>primers</i> e sondas utilizados para a detecção de variantes genéticos do PVY por RT-qPCR ..... 36
Tabela 3	Origem e denominação dos isolados analisados, sintomas induzidos nas plantas de batata e resultado da análise por TAS-ELISA e por RT-PCR ..... 43
Tabela 4	Resultados comparativos dos métodos de detecção utilizados, dados de quantificação da RT-qPCR para as estirpes analisadas, e resultados da RT-PCR específica para PVY <sup>E</sup> ..... 67

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO .....	13
2	REFERENCIAL TEÓRICO .....	16
2.1	Cultura e aspectos econômicos da batata ( <i>S. tuberosum</i> L.).....	16
2.2	Viroses de batata.....	18
2.3	<i>Potato virus Y</i> (PVY) e seus recombinantes .....	19
2.4	Transmissão e Sintomatologia .....	24
2.5	Métodos de diagnose de vírus.....	26
3	MATERIAL E MÉTODOS .....	31
3.1	Condução do experimento e obtenção das amostras.....	31
3.2	Origem e manutenção dos isolados virais.....	31
3.3	Coleta, processamento das amostras e avaliação dos sintomas .....	32
3.4	Detecção das estirpes de PVY por TAS-ELISA .....	32
3.5	Extração do RNA total.....	33
3.6	Síntese do cDNA e PCR multiplex.....	34
4	RT-qPCR .....	36
4.1	Desenho das Sondas e Primers .....	36
4.2	Elaboração da curva padrão .....	37
4.3	Extração de RNA, síntese de cDNA e ensaio qPCR.....	38
4.4	Validação do RT-qPCR para diagnose de <i>Potato virus Y</i> .....	39
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	40
5.1	Sintomas observados nas plantas de batata provenientes dos tubérculos infectados.....	40
5.2	Resultados obtidos no TAS-ELISA .....	51
5.3	Detecção e distinção de estirpes de PVY por RT-PCR multiplex e esboço da situação epidemiológica destas no campo .....	58
5.4	Detecção de estirpes de PVY em infecções simples e mistas por RT-qPCR .....	61
5	CONCLUSÕES .....	74
	REFERÊNCIAS.....	75

## 1 INTRODUÇÃO

A batata (*Solanum tuberosum*) possui ampla distribuição ao redor do mundo e está entre os principais produtos comercializados, ocupando o quarto lugar em volume de produção, atrás apenas do trigo, milho e arroz. No ano de 2013, a produção média mundial chegou a 368 milhões de toneladas. Porém, a susceptibilidade das variedades comercializadas, às diversas doenças, pode levar a perdas significativas, expressas pela redução da qualidade e produtividade das plantas (BRAVO-ALMONACID et al., 2012; GRAY et al., 2010; HANE; HAMM, 1999).

As viroses são um dos grandes problemas enfrentados pelos produtores de batata no país, uma vez que o seu controle é geralmente dificultado em função das três principais formas de disseminação da doença: mecânica, por enxertia e através de insetos vetores, causando rápida degenerescência dos tubérculos-sementes.

No Brasil, as condições climáticas do país favorecem a presença de afídeos o ano todo. A espécie *Myzus persicae* é o vetor que apresenta reconhecidamente a maior eficiência na transmissão do *Potato vírus Y*. A relação vírus/vetor é do tipo não persistente ou não circulativa, de modo que o pulgão adquire e transmite o vírus em poucos segundos, na “picada de prova”. A ampla distribuição geográfica do vetor é responsável por grande parte da disseminação do vírus (LOPES et al., 2014; QUENOUILLE; VASSILAKOS; MOURY, 2013).

Atualmente, o PVY encontra-se entre as dez principais viroses com importância econômica, sendo que a batata (*Solanum tuberosum*), o fumo (*Nicotiana spp.*), o tomate (*S. lycopersicum*) e a pimenta (*Capsicum spp.*) são as principais hospedeiras cultivadas. Em culturas de batata são descritos como sendo os mais comuns e agressivos vírus encontrados, ocasionando perdas que podem chegar a 80% do cultivo (DE BOKX; HUTTINGA, 1981; SCHOLTHOF et al., 2011).

Pertencente ao gênero *Potyvirus* (família *Potyviridae*), o PVY possui um genoma constituído por RNA de fita simples, senso positivo e com aproximadamente 9.7kb de tamanho, ligado covalentemente a uma proteína VPg ao terminal 5' e uma cauda poli(A) ao terminal 3'. O genoma é expresso como uma poliproteína de aproximadamente 3062 aminoácidos, que posteriormente é processado por três proteases específicas do vírus em 10 proteínas funcionais (BERGER et al., 2005; QUENOUILLE; VASSILAKOS; MOURY, 2013) Uma outra proteína foi recentemente encontrada, codificada separadamente da poliproteína, denomina PIPO (CHUNG et al., 2008).

De acordo com as reações observadas em plantas indicadoras de batata portando os genes de resistência *Ny*, *Nc* e *Nz*, e os sintomas apresentados em tabaco (*Nicotiana tabacum*), as estirpes de PVY foram classificadas em cinco grupos: PVY<sup>O</sup>, PVY<sup>C</sup>, PVY<sup>N</sup>, PVY<sup>Z</sup>, e PVY<sup>E</sup>. Nas últimas décadas, houve um aumento na prevalência de isolados recombinantes entre PVY<sup>O</sup> e PVY<sup>N</sup> descritos no mundo todo, apresentando grau de virulência variado e propriedades biológicas, sorológicas e moleculares muito próximas (DJILANI-KHOUDJA et al., 2010; GALVINO-COSTA et al., 2012b; JONES, 1990; SCHOLTHOF et al., 2011; SINGH et al., 2008; URCUQUI-INCHIMA; HAENNI; BERNARDI, 2001).

A frequente recombinação em PVY cria muitos desafios para os fitopatologistas, tanto na identificação precisa dessas estirpes no campo, quanto na previsão dos seus impactos sobre a produção. Devido à variedade de sintomas causados pelas diversas estirpes reconhecidas de PVY, é indispensável o uso de técnicas de diagnóstico específicas que apresentem aplicabilidade para diagnósticos rápidos e em grande escala, a fim de constatar a sua incidência no campo. No Brasil, poucos estudos foram realizados a fim de identificar o tipo de infecção predominante nos campos produtores. Assim sendo, amostras constituídas por folhas e tubérculos provenientes de campos localizados no sul de Minas Gerais foram analisadas



por DAS, TAS-ELISA, RT-PCR multiplex, e RT-qPCR, visando avaliar a ocorrência e incidência das principais estirpes de PVY, para elucidar alguns aspectos referentes à sua frequência e variabilidade nos campos produtores de batata.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Cultura e aspectos econômicos da batata (*S. tuberosum* L.)

A batata (*Solanum tuberosum* L.) é uma planta herbácea pertencente à família *Solanaceae*. Nativa da América do Sul foi originalmente encontrada nas Cordilheiras dos Andes, onde era consumida pela população local. Introduzida na Europa, no final do século XVI, tornou-se rapidamente base alimentar de diversos povos de outros continentes (AMARAL et al., 2012; BIRCH et al., 2012; TAVARES; CASTRO; MELO, 2002). Aproximadamente, mais de um bilhão de pessoas ao redor do mundo fazem uso da batata em sua dieta, por apresentar uma rica fonte de energia, nutrição, fácil cultivo e custo reduzido (INTERNACIONAL POTATO CENTER - CIP, 2013). Assim sendo, a batata tem sido foco de estudos substanciais, principalmente devido a seu uso como alimento básico na nutrição humana, por ser uma fonte significativa de elementos essenciais à saúde.

Mesmo possuindo um grande valor nutricional, o consumo médio de batata no Brasil é considerado relativamente baixo, em torno de 15 kg/habitante ano, enquanto nos países europeus o consumo ultrapassa 80 kg/habitante ano (FIGUEIREDO et al., 2011; TAVARES; CASTRO; MELO, 2002). Isso se deve, provavelmente, ao fato de que no Brasil o arroz e o feijão são alimentos básicos da maioria da população, ao contrário do que acontece nos países europeus.

Dentre os mais de 130 países produtores de batata no mundo, que apresentam uma produção anual de aproximadamente 368 milhões de toneladas, o Brasil ocupa a 20ª posição, com uma produção de 3,5 milhões de toneladas em 128 mil hectares de área plantada em 2013 (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS -

FAOSTAT, 2013). No mercado interno, em termos econômicos, a batata ocupa lugar relevante entre os produtos agrícolas mais importantes.

As regiões Sul e Sudeste do Brasil compõem o maior polo nacional produtor de batata, com destaque para o estado de Minas Gerais que produz 33% da safra anual, cerca de 1.182 mil t/ano (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE, 2013). Juntamente aos estados de São Paulo (17%), Paraná (21%) e Rio Grande do Sul (10%), totalizam mais de 80% da produção em três safras (AGRIANUAL, 2012; CAMARGO FILHO; ALVES, 2005; SOARES, 2012). A primeira é a safra das águas (primeira safra), em seguida a safra da seca (segunda safra) e finalmente a safra de inverno (terceira safra), estabelecidas de acordo com as condições edafoclimáticas de cada região.

No Sudeste brasileiro, a safra de inverno estrategicamente antecede a safra das águas devido às chuvas poucas e irregulares, de modo que é feito o plantio irrigado no trimestre abril-junho, com colheita de agosto a outubro. Já no início do ano agrícola julho-agosto, a safra das águas é iniciada, com possibilidade de cultivo por toda a primavera e colheita de outubro a março ou final do verão no Sudeste e Sul brasileiro. A safra da seca se inicia no primeiro trimestre do ano e a colheita pode se estender até julho. No Nordeste, devido ao regime pluviométrico diferenciado, é produzida apenas a segunda safra (CAMARGO FILHO; ALVES, 2005).

Embora no país o volume de produção seja considerado alto, a produtividade dessa hortaliça é baixa, comparada aos países mais desenvolvidos (COSTA et al., 2010). Isso pode ser reflexo de diversos fatores (abióticos ou bióticos), sendo o principal deles a incidência de doenças fúngicas, bacterianas, viróticas e/ou as causadas por nematoides. Devido ao potencial de agressividade de algumas doenças, a diagnose precoce delas dentro da lavoura é imprescindível para o estabelecimento de medidas efetivas de controle. Assim sendo, a busca constante por técnicas de

diagnose mais rápidas, precisas e confiáveis tem sido uma prioridade nos programas de pesquisa ligados à cultura da batata em todo o mundo.

## 2.2 Víroses de batata

Dentre as doenças que mais se destacam na cultura da batata estão as de etiologia viral. Os primeiros relatos de viroses em plantas de batata no Brasil datam da década de 1930. São descritas aproximadamente 40 tipos de viroses diferentes infectando batatas no mundo, e mais da metade delas já foram detectadas no país (KERLAN, 2006; SOUZA DIAS; IAMAUTI, 1997).

Os vírus comumente reconhecidos por comprometer a rentabilidade da cultura da batata são: *Potato leafroll virus* (PLRV) gênero *Polerovirus*; *Potato virus Y* (PVY) e *Potato virus A* (PVA), gênero *Potyvirus*; *Potato virus X* (PVX) gênero *Potexvirus*; *Potato virus S* (PVS), e *Potato virus M* (PVM) gênero *Carlavirus*, que causam no campo e durante a pós-colheita sintomas variados que vão de leves a severos acarretando perdas econômicas significativas do cultivo (KERLAN; MOURY, 2008; VALKONEN, 2007; YARDIMCI; KILIÇ; OZDEMIR, 2014).

No Brasil, o vírus do enrolamento da folha (PLRV) era considerado o único causador de perdas para o cultivo da batata. Porém com a introdução do *Potato virus Y* em tubérculos-semente provenientes de importação, o quadro epidemiológico do país sofreu uma mudança drástica devido ao alto potencial de disseminação deste vírus no campo. O constante monitoramento do PLRV e do PVY é uma prática rotineira nos campos produtores de batata no mundo todo (VALKONEN, 2007; WANG et al., 2011). Atualmente, o vírus do enrolamento da folha (PLRV) encontra-se sob controle, assim como os vírus PVX, PVS, PVA e PVM. Estes últimos não apresentam relevância epidemiológica no país, uma vez que os níveis de detecção para os mesmos são muito baixos. Isto porque os tubérculos-semente utilizados para plantio

têm sido constantemente monitorados, por razões que variam desde a incidência até a necessidade de proteger o país contra a entrada de material importado, apresentando alta incidência dos vírus (AVILA; MELO; LEITE, 2007; FIGUEIRA, 2002; SILVA et al., 2005).

Diversas medidas são necessárias para controlar a disseminação dessas doenças nas lavouras. Entre elas, conhecer a ecologia das viroses é imprescindível para a produção adequada de tubérculos-sementes. A utilização de sementes certificadas, que ainda é a medida mais importante para evitar a introdução precoce dos vírus nas lavouras, além do uso de cultivares resistentes e o controle dos vetores que também são medidas indispensáveis para obter sucesso nessa cultura (HALTERMAN; CHARKOWSKI; VERCHOT, 2012; PELLETIER et al., 2012).

### **2.3 *Potato virus Y (PVY) e seus recombinantes***

O *Potato virus Y (PVY)* é a espécie tipo do gênero *Potyvirus* (família *Potyviridae*) que contém a maioria dos vírus economicamente importantes para o Brasil e o mundo. O PVY foi descrito pela primeira vez por Smith em 1931, e desde então, tem sido um dos principais vírus de planta estudados, especialmente por estar intimamente associado à degeneração da batata (HARRISON et al., 1971; KERLAN, 2006; SCHOLTHOF et al., 2011; SHUKLA; WARD; BRUNT, 1994; SMITH, 1931).

Assim como todos os membros do gênero *Potyvirus*, o genoma do PVY é constituído de uma fita simples de RNA senso positivo (ssRNA+), apresentando uma cauda poly (A) no terminal 3' e uma proteína VPg covalentemente ligada ao terminal 5'. Essas estruturas terminais atuam na proteção e replicação do genoma, e também como reguladores da expressão gênica. O genoma de ssRNA+, com aproximadamente 9.7kb, codifica uma ORF (Open Reading Frame) flanqueada por duas regiões não traduzidas, e

expressa como uma poliproteína de aproximadamente 3062 aminoácidos. Essa poliproteína viral é autoclivada em 10 proteínas funcionais (P1, HC-Pro, P3, 6K1, CI, 6K2, VPg, NIa, Nib e CP) por três proteases específicas do vírus (BERGER et al., 2005; KARASEV; GRAY, 2013; LARBI et al., 2012; RIECHMANN et al., 1992).

Chung et al. (2008) descobriram uma segunda ORF conservada na família *Potyviridae* denominada PIPO, incorporada à ORF maior (poliproteína) na região do cistron P3 com tamanho variável entre os potyvirus. Esta nova ORF é traduzida no frame +2 de leitura e, possivelmente está envolvida na replicação, movimento, supressão do silenciamento sistêmico ou ainda em uma combinação de outras funções. Estudos realizados por Wei et al. (2010), confirmaram que a proteína P3N-PIPO coordena, junto a proteína CI codificada pela poliproteína, o movimento célula-a-célula através da formação de estruturas cônicas nos plasmodesmos que permitem o movimento intercelular.

Em *Potato virus Y* (PVY) a variação de sequências de nucleotídeos do gene PIPO extraídos de batata, quando comparadas com outras sequências de estirpes de PVY publicadas, apresentaram 92% de similaridade indicando que o gene PIPO em PVY é altamente conservado. Desta forma sugere-se que o gene PIPO possa ser um novo marcador para análise filogenética do gênero (GAO, 2013). Cuevas et al. (2012) também observaram que a P3N-PIPO apresenta tamanhos variáveis comparando diferentes isolados de PVY, o que permite classificá-los em grupos distintos.

Entre as proteínas codificadas pelo genoma do gênero *Potyvirus* existe alta similaridade, deste modo é possível inferir sobre a função de cada uma delas fazendo uma analogia entre os membros deste grupo. As três proteases virais específicas responsáveis pela clivagem da poliproteína durante o processamento do genoma viral são NIa, P1 e HC-Pro. A primeira proteína codificada pela região 5' do genoma do PVY (P1) exerce, além da atividade proteolítica, forte influência sobre a sintomatologia e o movimento

do vírus célula-a-célula. A Helper Component-Proteinase (HC-Pro) está diretamente ligada à transmissão por afídeos, replicação do RNA viral, movimento sistêmico, intensidade do sintoma e atua, inclusive, como supressora do silenciamento gênico na planta. A proteína P3 desempenha papel importante na patogenicidade e replicação viral, enquanto a proteína inclusão citoplasmática (CI), possui atividade de ATPase, RNA helicase, e também está associada ao movimento célula-a-célula, replicação e formação de inclusões citoplasmáticas. A VPg auxilia na transmissão por afídeos e no movimento célula-a-célula. A NIa-Pro ou (inclusão nuclear a) atua na localização celular, na replicação viral, na especificidade ao hospedeiro, e na interação proteína-proteína. A NIb (inclusão nuclear b) é a RNA polimerase dependente do RNA (RdRp) nos Potyvirus, e possui atividade de replicase, sendo geralmente responsável pela formação de inclusões no núcleo de plantas infectadas. As duas proteínas pequenas 6K1 e 6K2 estão provavelmente relacionadas ao processo de replicação do RNA viral (ADAMS; ANTONIW; FAUQUET, 2005; BRAULT et al., 2010; CARRINGTON; JENSEN; SCHAAD, 1998; PRUSS et al., 1997; RIECHMANN et al., 1992; TIAN; VALKONEN, 2015; URCUQUI-INCHIMA; HAENNI; BERNARDI, 2001; VERCHOT; CARRINGTON, 1995).

A partícula do PVY possui uma única proteína capsidial (CP) de 267 aminoácidos (aa), codificada pelo fragmento C-terminal da poliproteína. Esta proteína tem a função de encapsidar o RNA viral, formando uma partícula simétrica alongada e flexível, de aproximadamente 740nm de comprimento e 11nm de diâmetro (DE BOKX; HUTTINGA, 1981; DELGADO-SANCHEZ; GROGAN, 1970; KARASEV; GRAY, 2013). Além da encapsidação viral, está associada à transmissão por afídeos, no movimento sistêmico célula-a-célula, e na regulação da amplificação do RNA (ROJAS et al., 1997; URCUQUI-INCHIMA; HAENNI; BERNARDI, 2001).

Vírus, especialmente os de RNA, exibem um alto grau de variabilidade que é resultado de três fenômenos que afetam seu genoma: mutação, recombinação e rearranjo de segmentos do genoma (GLAIS; TRIBODET; KERLAN, 2002). A recombinação de segmentos de RNA pode ter diferentes funções durante o ciclo de vida viral, tais como: o reparo do RNA defeituoso, o aumento da variabilidade de sequências, e facilitar a adaptação e evolução dos vírus (NAGY; BUJARSKI, 1998). Essas trocas podem ocorrer entre dois vírus ou duas estirpes virais diferentes, ou até mesmo entre o vírus e seu hospedeiro (WOROBAY; HOLMES, 1999).

De acordo com Revers et al. (1996) o rearranjo genético causado pela recombinação pode levar ao aparecimento de novos isolados de vírus no campo, alguns dos quais podem adquirir novas propriedades biológicas. Eventos de recombinação já foram encontrados em vários grupos, inclusive entre as diferentes estirpes de PVY encontradas atualmente (GALVINO-COSTA; 2012b; GLAIS; TRIBODET; KERLAN, 2002; KERLAN et al., 2011; SIMON; BUJARSKI, 1994). Hu et al. (2009), avaliando algumas estirpes de PVY de acordo com os eventos de recombinação, observaram nove padrões diferentes, que são resultantes da presença de uma até oito junções de recombinação (JR).

Tradicionalmente, os isolados de PVY foram inicialmente classificados em três grupos de estirpes principais: PVY<sup>O</sup>, PVY<sup>N</sup> e PVY<sup>C</sup>, sendo estas estirpes não recombinantes. À medida que a variabilidade das estirpes passou a ser estudada mais detalhadamente, novas classificações foram surgindo. Uma delas é a classificação em estirpes genéticas, feita de acordo com a reação de hipersensibilidade (HR) observada em cultivares de batatas, indicadoras e em sintomas induzidos em fumo (*Nicotiana tabacum*). Com base nesses critérios, as estirpes genéticas descritas são: PVY<sup>O</sup>, PVY<sup>C</sup>, PVY<sup>N</sup>, PVY<sup>Z</sup> e PVY<sup>E</sup> (BECZNER et al., 1984; BLANCO-URGOITI et al., 1998; DE BOKX; HUTTINGA, 1981; GALVINO-COSTA et al., 2012b;



JONES, 1990; KERLAN et al., 2011; KERLAN; LE ROMANCER, 1999; SINGH et al., 2008; SOUZA DIAS; IAMAUTI; 1997).

Outra classificação é a chamada classificação de estirpes moleculares, esta se baseia na estrutura genômica do vírus e separa as estirpes em não recombinantes (PVY<sup>O</sup>, PVY<sup>N</sup>, PVY<sup>C</sup>) e recombinantes (PVY<sup>NTN</sup>, PVYN:O/N-Wi, PVY<sup>N:O</sup>, PVY<sup>E</sup>, PVY<sup>NE-11</sup>, PVY<sup>NA</sup>, PVY<sup>NA-N/NTN</sup>, PVY<sup>ZNTN</sup>, PVY<sup>NTN-NW</sup>). A análise das sequências de nucleotídeos possibilita identificar cada recombinante de PVY, comparando-os aos tipos parentais PVY<sup>O</sup> e PVY<sup>N</sup>. Isto porque, a maioria dos recombinantes é uma mistura de segmentos genômicos destes dois parentais, modificando-se apenas o número e as posições em que cada evento de recombinação ocorreu ao longo da evolução de cada estirpe viral. O PVY<sup>NTN</sup>, por exemplo, apresenta uma estrutura genômica recombinante portadora de 3-4 junções de recombinação (JR), enquanto o PVY<sup>N:O/N-Wi</sup> apresenta de 1-2 JR (GLAIS; TRIBODET; KERLAN, 2002; LORENZEN et al., 2006a; SINGH et al., 2003).

Nas últimas décadas uma vasta gama de estirpes e variantes com diferentes graus de virulência, e apresentando propriedades biológicas, sorológicas e moleculares atípicas tem sido observada. Galvino-Costa et al. (2012) identificaram dois isolados recombinantes entre os genomas parentais de PVY<sup>NTN</sup> e PVY-NE-11, os quais foram descritos como uma nova estirpe recombinante chamada PVY<sup>E</sup>.

Até o momento, constam na literatura nove estirpes recombinantes oficialmente publicadas (citadas no parágrafo anterior), as quais possuem significativo potencial para causar novos índices de perdas nas lavouras, uma vez que, devido às variações genômicas inéditas não se sabe qual será o efeito da interação vírus-planta sobre as cultivares de batatas brasileiras mais plantadas nos últimos anos.

## 2.4 Transmissão e Sintomatologia

O PVY é eficientemente transmitido por mais de 40 espécies de afídeos, principalmente pela espécie *Myzus persicae*, de um modo não persistente ou estiletar, tornando difícil seu controle. No modo não persistente, o vírus é adquirido em questão de segundos e conservado por apenas alguns minutos por seus vetores. Também podem ser transmitidos mecanicamente através de extratos de plantas infectadas, ou vegetativamente por enxertia em tubérculos de batata contaminados (HARRINGTON; KATIS; GIBSON, 1986; KARASEV; GRAY, 2013; KERLAN, 2006; SALAS; LOPES; FERERES, 2010; SCHOLTHOF et al., 2011; WATSON; ROBERTS, 1939).

A disseminação das partículas virais dos *Potyvirus* por afídeos vetores é mediada por um produto funcional denominado “*helper component*” ou HC-Pro, codificado pela região N-terminal da poliproteína. A hipótese de ponte sugere que a HC-Pro interage com o estilete dos afídeos vetores através de regiões altamente conservadas como o domínio peptídil “KITC” (Lys-Ile-Thr-Cys), e o “PTK” (Pro-Thr-Lys) localizado na porção N-terminal e C-terminal da sequência da HC-Pro, respectivamente. Estes domínios são responsáveis por ligar a proteína da capa viral a receptores desconhecidos do aparelho bucal do inseto. Por outro lado, outro domínio conservado denominado “DAG” (Asp-Ala-Gly), localizado próximo ao N-terminal da proteína capsidial do vírus também pode estar envolvido na transmissão por afídeos. Neste caso, a região N-terminal da CP pode ligar-se diretamente ao aparelho bucal do vetor através de uma mudança conformacional da CP do vírus pela proteína HC (AMMAR; JARLFORS; PIRONE, 1994; BLANC et al., 1997, 1998; BRAULT et al., 2010; PIRONE; BLANC, 1996).

Embora uma das principais fontes de preocupação sejam as perdas relativas à batata, muitas outras culturas da família *Solanaceae* sofrem com

danos significativos na produtividade: fumo, tomate e pimenta (DE BOKX; HUTTINGA, 1981; KERLAN, 2006; QUENOUILLE; VASSILAKOS; MOURY, 2013). Além destas, outras hospedeiras podem servir de reservatórios naturais como espécies das famílias *Chenopodiaceae* e *Leguminosae* (DE BOKX; HUTTINGA, 1981).

Em batata os sintomas causados por PVY podem afetar tanto folhas quanto tubérculos. O aparecimento dos sintomas e a intensidade dependem da cultivar de batata infectada, a estirpe de PVY associada às condições ambientais, bem como, o tipo de infecção: primária – que consiste na infecção durante o primeiro ano de plantio, ou secundária – proveniente do plantio de tubérculos infectados, que geram plantas infectadas em plantios subsequentes. Geralmente os sintomas causados em infecções primárias são leves e podem surgir apenas no fim da estação de crescimento. Por outro lado, os sintomas secundários podem ser visualizados no início da estação de crescimento apresentando sintomas mais graves (DE BOKX; HUTTINGA, 1981).

Os sintomas observados em plantas infectadas com PVY incluem mosaico simples ou rugoso, algumas vezes associados com distorção foliar ou encarquilhamento. Estes sintomas em geral levam ao retardamento do crescimento e/ou nanismo da planta, podendo também ser observadas diferentes reações necróticas com lesões locais, amarelecimento sistêmico, necrose de nervuras ao longo da planta, e anéis necróticos no tubérculo de batata (PTNRD – *potato tuber necrotic ringspot disease*) (BECZNER et al., 1984; DE BOKX; HUTTINGA, 1981; KARASEV; GRAY, 2013; TRIBODET et al., 2005). Glais, Tribodet e Kerlan (2002) comparando as características moleculares com as propriedades patogênicas dos isolados analisados, sugeriram que os sintomas de necrose causados por estirpes de PVY podem estar relacionados à HC-Pro, induzindo necrose em folhas de fumo, e o NIA, Nib e/ou proteína CP na necrose em tubérculos de batata.

Em plantas com infecções virais mistas os sintomas geralmente apresentam sintomas mais graves, e o aumento dos níveis de titulação de um ou ambos os vírus (SRINIVASAN; ALVAREZ, 2007). As infecções mistas podem ocorrer entre dois ou mais vírus distintos ou por duas ou mais estirpes diferentes do mesmo vírus, resultando em interações complexas com tipos de fenótipos imprevisíveis da doença. A coinfeção da planta hospedeira geralmente ocorre de duas formas, sinérgica ou antagónica. O resultado das interações vírus-vírus em antagonismo varia de exclusão mútua, a eventual protecção cruzada. Em contraste, o sinérgismo pode manifestar-se por um aumento na replicação viral, ou na cooperação e coexistência entre os membros do complexo viral, afetando ambos ou pelo menos um dos vírus envolvidos, nesse caso o efeito dos sintomas sobre o hospedeiro torna-se maior do que a soma dos efeitos individuais (ELENA; BERNET; CARRASCO, 2014; SYLLER, 2012).

Syller e Grupa (2014), avaliando isolados de PVY representados pelos grupos: PVY<sup>O</sup>, PVY<sup>N:O/N-Wi</sup> e PVY<sup>NTN</sup> através de diferentes métodos de diagnose, observaram reduções significativas nas concentrações de certos isolados de PVY durante a coinfeção. Além disso, eles também observaram que as maiores e menores taxas de transmissão do vírus pelos pulgões, individualmente, foram observadas para os isolados de PVY<sup>NTN</sup> e PVY<sup>O</sup>, respectivamente. Os pulgões individuais de *M. persicae* foram capazes de transmitir simultaneamente dois isolados de PVY, evidenciando que o efeito da disseminação de vírus nas lavouras infectadas pode ser agravado na presença de infecções mistas de estirpes de PVY.

## 2.5 Métodos de diagnose de vírus

O controle eficiente de PVY exige a disponibilidade de métodos confiáveis de detecção e identificação de estirpes de PVY. Os métodos frequentemente utilizados para esse fim têm demandado constante

atualização devido ao crescente número de novas estirpes variantes surgidas a cada ano. Atualmente, o grande objetivo da maioria dos produtores é reduzir a incidência de PVY no campo. Porém, em algumas variedades de batata os sintomas foliares de PVY são muito leves e quase imperceptíveis, impossibilitando a identificação de plantas infectadas no campo ou mesmo durante a certificação de lotes de tubérculos-semente.

Inicialmente, eram utilizadas informações baseadas nas propriedades sorológicas da proteína do capsídeo viral e na gama de hospedeiros, com o objetivo de identificar e caracterizar os vírus de plantas. As propriedades imunogênicas de PVY em interações antígeno-anticorpo estudadas foram utilizadas para a formulação de anticorpos policlonais e/ou monoclonais para ensaios sorológicos do tipo ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) utilizando sanduíche duplo (DAS) ou triplo (TAS) (GURGELI; FRIES, 1983; MAAT; DE BOKX, 1978; SHUKLA et al., 1989; SHUKLA; WARD, 1989). Esses anticorpos foram utilizados de forma satisfatória por muitos anos na detecção dos isolados de PVY. No entanto, o surgimento das muitas variantes de PVY evidenciou as limitações das ferramentas disponíveis com base sorológica, uma vez que estas, apenas são capazes de distinguir entre PVY<sup>O</sup>, PVY<sup>N</sup> ou PVY<sup>C</sup>, mas não diferenciam isolados do tipo N de NTN ou O de N:O. Desta forma, estirpes que apresentem o mesmo sorotipo não podem ser identificadas separadamente através do método DAS-ELISA, por ele utilizar anticorpos policlonais, capazes de reagir com qualquer uma das estirpes de PVY (KARASEV et al., 2010; SINGH et al., 2008).

O TAS-ELISA, que emprega anticorpos monoclonais para o reconhecimento de estirpes específicas, também, nem sempre é eficiente, porque algumas estirpes apresentam a mesma capa proteica e recombinações em outros segmentos do genoma. Assim sendo, a técnica RT-PCR (*reverse transcription polymerase chain reaction*) poderia ser uma alternativa mais eficiente, pois permite o desenho de *primers* para os segmentos específicos em que ocorreu a variabilidade (CHIKH-ALI et al., 2010; NIE; SINGH,

2002). Geralmente o uso combinado das técnicas diagnósticas é a melhor abordagem para a obtenção de resultados mais confiáveis e com maior grau de sensibilidade. A imunocaptura, por exemplo, pode ser usada para melhorar a sensibilidade e/ou especificidade de testes de PCR, e assim superar os problemas relacionados a inibidores nas amostras (WARD et al., 2004).

As diversas ferramentas descritas para diagnose como, por exemplo, a fluorescência competitiva RT-PCR (WALSH et al., 2001), o multiplex imunoensaio de microesfera (MIA) (BERGERVOET et al., 2008), a RT-PCR (BOONHAM et al., 2002; DU; CHEN; HIRUKI, 2006; NIE; SINGH, 2002; RIGOTTI; GUGERLI, 2007), e a imunocaptura (IC)-RT-PCR e multiplex RT-PCR, entre outras, são ferramentas eficientes na capacidade de detectar isolados de PVY, mas não são ferramentas quantitativas (NIE; SINGH, 2003).

Em contrapartida, a técnica de PCR em tempo real (qPCR), apresenta todos os requisitos para uma detecção rápida, e quantificação precisa, inclusive de quantidades mínimas de ácidos nucleicos (HEID et al., 1996; SAPONARI; MANJUNATH; YOKOMI, 2008). A PCR em tempo real desenvolvida para fitovírus cujo genoma é RNA (RT-qPCR) proporcionou resultados satisfatórios em vários estudos já descritos (BALME-SINIBALDI et al., 2006; FAGERIA et al., 2013; SINGH et al., 2013; TANG et al., 2014). O diferencial dessa técnica consiste no acompanhamento da reação a cada ciclo, apresentando elevado rendimento, sensibilidade, especificidade, reprodutibilidade quando comparado ao RT-PCR convencional. O princípio do método consiste na quantificação dos ácidos nucleicos durante a fase exponencial da reação. O ponto que detecta quando o ciclo atinge o limiar da fase exponencial da reação é denominado “*Cycle Threshold*” ( $C_T$ ). Neste ponto, é possível a quantificação exata e reproduzível da amostra com base na fluorescência emitida. Compostos fluorescentes, presentes na reação, têm a função de gerar sinais luminosos

que aumentam proporcionalmente a quantidade de produto da PCR, assim os valores da fluorescência vão sendo gravados durante cada ciclo, representando o produto amplificado (NOVAIS; PIRES-ALVES, 2004; SAPONARI; MANJUNATH; YOKOMI, 2008).

Um dos tipos de RT-qPCR utiliza sondas de hidrólise, que possibilitam tanto a detecção de vírus em infecções simples quanto em mistas, além de permitir a diferenciação de duas ou mais estirpes muito próximas em uma mesma planta hospedeira (AGINDOTAN; SHIEL; BERGER, 2007; DUBIELA et al., 2013; OSMAN et al., 2013). Essa técnica se baseia na detecção e monitoramento em tempo real da atividade exonuclease 5'-3' da Taq DNA polimerase que é responsável por degradar a sonda (HOLLAND et al., 1991). Neste sistema são utilizados dois *primers* específicos (*forward* e *reverse*) para uma determinada sequência de DNA alvo, juntamente a sonda de hidrólise complementar à região do fragmento de DNA entre os *primers*. As sondas são constituídas de oligonucleotídeos ligados a um fluorocromo com especificidade para uma determinada sequência de DNA alvo. Na extremidade 3' dessas sondas é ligada uma molécula *quencher* responsável por captar a energia da molécula repórter e dissipá-la na forma de luz ou calor, e na extremidade 5' um fluorocromo repórter. A proximidade entre estas duas moléculas *quencher* e reporter no início da reação suprime a detecção da fluorescência pela transferência de energia. Em seguida, à medida que ocorre a amplificação do DNA pelos *primers* a atividade de exonuclease 5'-3' da Taq DNA polimerase cliva a sonda liberando o fluoróforo. Desta forma, a quantidade de fluorescência monitorada é proporcional a quantidade de produto de PCR gerado, possibilitando detectar exclusivamente a sequência específica nos fragmentos de DNA amplificados durante cada ciclo (BUSTIN et al., 2009; LUIGI; FAGGIOLI, 2011; NOVAIS; PIRES-ALVES, 2004).

Embora a tecnologia de PCR em tempo real, utilizando sondas de hidrólise, possam elevada especificidade e sensibilidade, ainda é

rotineiramente substituída por metodologias menos sensíveis e confiáveis e ainda bastante laboriosas, resultado do elevado custo atribuído à técnica. No entanto, considerando o nível de acurácia deste tipo de diagnose, torna-se necessário o desenvolvimento de ensaios específicos que possibilitem uma detecção rápida e altamente precisa para as fitoviroses de maior importância para o país.



### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Condução do experimento e obtenção das amostras

Os experimentos foram conduzidos em casa de vegetação, no laboratório de Virologia Molecular, e no Centro de Indexação de Vírus de Minas Gerais (CIV-MG) localizados no Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Lavras (DFP/UFLA).

Foram utilizados, no presente trabalho, dois tipos de material vegetal: a) tubérculos ou folhas de batatas selecionados a partir de lotes indexados no CIV-MG, recebidos de diferentes campos produtores, e b) tubérculos coletados em Lavras-MG de estabelecimentos revendedores de batata (verdurões, feiras, supermercados). Cada material coletado foi identificado e os testes sorológicos e moleculares foram posteriormente realizados como descrito a seguir.

#### 3.2 Origem e manutenção dos isolados virais

Os isolados de PVY<sup>N:O/N-Wi</sup>, denominado PED-AX e de PVY<sup>NTN</sup>, denominado LUI-AGA, foram provenientes da coleção de vírus mantida no laboratório de Fitopatologia do DFP/UFLA (GALVINO-COSTA et al., 2012a). A sua multiplicação foi feita por inoculação de material dessecado em plantas de fumo (*Nicotiana tabacum*) cv. Turkish e Turkish NN. Para a padronização das técnicas, as duas estirpes que foram detectadas nos testes sorológicos e RT-PCR, foram inoculadas separadamente e em combinação (NTN + Wilga) nas plantas de fumo. Plantas de fumo não inoculadas serviram como controle.

Para a inoculação mecânica, tecidos dessecados de plantas de fumo, infectadas com as estirpes citadas, foram triturados em presença de tampão fosfato de sódio 0,001M pH 7,0 contendo sulfito de sódio na mesma

molaridade, e o extrato obtido foi friccionado nas folhas das plantas receptoras previamente pulverizadas com carborundum (600 mesh) como abrasivo.

As plantas infectadas foram analisadas por DAS e TAS-ELISA, RT-PCR multiplex (conforme será descrito posteriormente) e RT-qPCR, cerca de 3 a 4 semanas após a inoculação. Durante toda a realização dos experimentos as plantas foram mantidas em casa de vegetação, a uma distância segura entre os dois isolados, para que não houvesse contaminação.

### **3.3 Coleta, processamento das amostras e avaliação dos sintomas**

O material de batata coletado (folhas e/ou tubérculos) foi inicialmente analisado por DAS-ELISA para determinar a presença dos seguintes vírus: PVY, PVX, PVS e PLRV. Foram empregados antissoros policlonais da Agdia, seguindo o protocolo sugerido pelo fabricante. Os materiais infectados apenas pelo PVY foram selecionados, sendo que as folhas foram diretamente processadas através da obtenção do extrato de parte delas para posterior análise por TAS-ELISA e extração do RNA total para futuro processamento por RT-PCR e RT-qPCR. Os tubérculos foram tratados com ácido giberélico a 10ppm e, após a brotação, plantados em casa de vegetação para a análise das plantas deles originadas, conforme feito para as folhas.

### **3.4 Detecção das estirpes de PVY por TAS-ELISA**

Na técnica sorológica TAS-ELISA foram realizados dois testes distintos empregando anticorpos de diferentes origens, para garantir a detecção das estirpes: em um dos testes foi empregado um anticorpo policlonal (UID8) e dois anticorpos monoclonais da empresa Agdia: MAb2, que detecta o PVY<sup>O</sup>, PVY<sup>N:O</sup>, PVYN:O/N-Wi e a estirpe PVY<sup>C</sup>

(MCDONALD; KRISTJANSSON, 1993) e o IF5 que detecta estirpes de PVY<sup>N</sup>, PVY<sup>O-05</sup> e PVY<sup>NTN</sup> (ELLIS; STACE-SMITH; VILLIERS, 1996; KARASEV et al., 2010); no segundo teste foram empregados o anticorpo policlonal G500, e os monoclonais SASA-O, específico para PVY<sup>O</sup>, PVY<sup>N:O</sup>, PVY<sup>N:O/N-Wi</sup> e PVY<sup>C</sup>, e o SASA-N que detecta PVY<sup>N</sup> e PVY<sup>NTN</sup>, seguindo-se o protocolo do fabricante com modificações conforme descrito por Karasev et al. (2010). Foram utilizados como controles positivos para os testes sorológicos os dois isolados virais já discriminados (PED-AX e LUI-AGA), inoculados separadamente nas plantas de fumo.

Foram analisadas 165 amostras com a utilização dos anticorpos monoclonais específicos para estirpe necrótica (IF5 e SASA-N) e estirpe comum (MAb2 e SASA-O), constituídas por tubérculos e folhas de batata que apresentaram resultado positivo para PVY, no teste DAS-ELISA. Dessas amostras, 154 foram coletadas a partir de lotes de sementes indexados pelo Centro de Indexação de Vírus – CIV-MG, e 11 foram provenientes de estabelecimentos revendedores, tais como: mercados, feiras e verdurões locais.

### **3.5 Extração do RNA total**

A extração do RNA total foi realizada seguindo o método Trizol (AFGC PROTOCOLS, 2014). As folhas jovens infectadas foram maceradas na presença de nitrogênio líquido e o pó obtido foi homogeneizado com a solução extratora Trizol (38% de fenol saturado, 0,8M de tiocianato de guanidina, 0,4M de tiocianato de amônio e 0,1M de acetato de sódio, pH 5 e 5% de glicerol), na proporção de 1g de tecido / 5mL solução. Em seguida, o extrato obtido foi transferido para microtubos e esses foram incubados em banho-maria por 5 minutos a 60 °C e centrifugados a 12.000 rpm por 10 minutos, a 4 °C. O pellet foi descartado e o sobrenadante transferido para novos microtubos, adicionando-se a eles 300µL de clorofórmio. Esses tubos

foram agitados em vórtex e deixados à temperatura ambiente por 3 minutos e, em seguida, centrifugados a 12.000 rpm por 10 minutos, a 4 °C. Após a transferência da fase aquosa para novos tubos, foi adicionado ½ volume, do sobrenadante coletado, de solução contendo 0,8M de Citrato de Sódio + 1,2M de Cloreto de Sódio e ½ volume de isopropanol. Em seguida, os tubos foram agitados cuidadosamente por inversão e deixados à temperatura ambiente por 10 minutos, com posterior centrifugação a 12.000 rpm por 10 minutos, a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado com etanol 70% gelado (-20 °C). O RNA foi, então, seco a vácuo e ressuspendido em 25µL de água ultrapura tratada com dietilpirocarbonato (DEPC). O RNA total extraído foi analisado em gel de agarose a 0,7%, contrastado com *Gel Red Nucleic Acid Gel Stain* (Biotium), antes de ser utilizado nos testes subsequentes. A avaliação de integridade e pureza do RNA total extraído foi realizada pelo equipamento NanoVue Plus™(GE Healthcare), separado em alíquotas e armazenado a -80 °C para posterior utilização nos testes de RT-PCR e RT-qPCR.

### 3.6 Síntese do cDNA e PCR multiplex

O teste RT-PCR Multiplex empregado foi o descrito por Lorenzen et al. (2006a), empregando-se um conjunto de oito *primers*, que estão discriminados na Tabela 1.

Tabela 1 Combinação de *primers* empregados para a detecção das diferentes estirpes de PVY por meio de RT-PCR multiplex

<b>Vírus</b>	<b>Primers</b>	<b>Amplificação (pb)</b>
PVY <sup>NTN</sup> , PVY <sup>N-Wi</sup>	N2258 + o2439c	181bp
PVY <sup>O</sup>	O2172 + o 2439c	267bp
PVY <sup>N</sup>	N2258 + n2650c	398bp
PVY <sup>N</sup> , PVY <sup>NA-N/NTN</sup>	N5707 + A6032m	328bp
PVY <sup>NTN</sup>	S5585 + A6032m	452bp
PVYN:O/N-Wi, PVY <sup>O</sup>	S5585 + 06266c	689bp

Fonte: Lorenzen et al. (2006a)

Para a síntese do cDNA, 1,2µL do RNA total, extraído da planta infectada foi incubado à temperatura de 70 °C por 5 min. Em seguida foram adicionados 0,6µL da enzima Superscript II (Invitrogen), 6µL de 5x RNA Buffer, 12µL de dNTP (2,5mM), 0,3µL de RNase out, 1,2µL de Oligo dT (3µM), 8,7µL de água ultrapura tratada com DEPC. A reação foi submetida à temperatura de 25 °C por 2 min e em seguida essa temperatura aumentou 1 °C a cada 30s por 17 vezes, ficando no final a 42 °C por 45min. Após alcançar essa temperatura, houve novamente um incremento de 1 °C a cada 2 min durante 18 ciclos, e finalmente a reação foi mantida a 70 °C por 10min, sendo transferida imediatamente para o gelo para posterior utilização na reação de amplificação (PCR).

A reação de PCR multiplex para cada isolado de PVY foi constituída por 7,95µL de água ultrapura com DEPC, 0,75 de MgCl<sub>2</sub> (50mM), 1,6µL de dNTP mix (2,5mM), 2µL de 10x tampão do PCR, 6,4µL da mistura de *primers* na concentração de 3µM cada, 0,3µL de TAQ DNA polimerase (INVITROGEN) e 1µL do cDNA obtido na reação anterior. Foram empregados 33 ciclos de amplificação, sendo eles distribuídos em duas etapas. A primeira foi: 95 °C/2min, 11 ciclos de 95 °C/30s, 66 °C/30s e 72 °C/1min, diminuindo a temperatura de anelamento em 0,5 °C/ciclo. A segunda foi: 22 ciclos de 95 °C/30s, 60 °C/30s e 72 °C/1min, com extensão final a 72 °C/7min.

Uma reação de PCR adicional foi realizada utilizando os *primers* AGA-8031F, descrito por Galvino-Costa et al. (2012b), e NE11-9026R, descrito por Lorenzen et al. (2008), para identificar possíveis isolados pertencentes à estirpe PVY<sup>E</sup>, os quais teriam sido inicialmente classificados como estirpe NTN na RT-PCR multiplex. O ciclo da reação de PCR utilizado iniciou-se em 94 °C por 2min, seguido por 30 ciclos de 94 °C/1min, 60 °C/1min e 72 °C/2min, com extensão final de 72 °C por 5min.

Após os ciclos de amplificação, os resultados da PCR foram verificados em gel de agarose a 0,7%, contrastado com *Gel Red Nucleic Acid Gel Stain* (Biotium).

#### 4 RT-qPCR

O sistema de detecção utilizado na reação de RT-qPCR, bem como o método utilizado para a análise quantitativa do número de partículas virais presentes nas amostras foi realizado conforme descrito a seguir:

##### 4.1 Desenho das Sondas e *Primers*

Foram utilizados dois conjuntos de sondas e *primers* desenvolvidos por Santos (2014) através do programa Primer Quest (Integrated DNA Technologies, IDT®), e com base nas regiões do genoma portadoras das junções de recombinação específicas das estirpes PVY<sup>NTN</sup> e PVY<sup>N:O/N-Wi</sup>. Foi necessário substituir o *primer reverse* qNTN-R (SANTOS, 2014) pelo A6032m-R, descrito por Lorenzen et al. (2006a), para obtenção de uma detecção mais específica do PVY<sup>NTN</sup>. As sequências dos *primers* e sondas utilizados estão indicadas na Tabela 2.

Tabela 2 Sequência de nucleotídeos dos *primers* e sondas utilizados para a detecção de variantes genéticos do PVY por RT-qPCR

Variante detectado	Conjunto de <i>primers</i> /sondas utilizados	Amplicon
PVY <sup>NTN</sup>	<i>Primer</i> qNTN-F: 5'-GGGCTGGCTTTGAAATTGAC- 3' <i>Primer</i> A6032m-R: 5'- CTTGCGGACATCACTAAAGCG- 3' <i>Sonda</i> qNTN-P: 5'HEX-TGGATCTGCATACAGGAAGAAGGGA- 3'	265pb
PVY <sup>Wi</sup>	<i>Primer</i> qWi-F: 5-ACGCGCATCCAGAAGAAA- 3' <i>Primer</i> qWi-R: 5'-TCTCCACCAGCAATAGTGATCTTTGAC- 3' <i>Sonda</i> qWi-P: 5' Cy5-TCACTTCCAGATGGCAGCTCCTAGTA- 3'	125pb

Fonte: Modificado de Santos (2014) (Dados não publicados)

#### 4.2 Elaboração da curva padrão

Os fragmentos amplificados para a elaboração da curva padrão de cada uma das estirpes controle PVY<sup>NTN</sup> e PVY<sup>N:O/N-Wi</sup> utilizadas nos testes, foram obtidos através da RT-PCR utilizando os *primers* descritos no Item 4.1. O ciclo utilizado para a reação de PCR iniciou-se em 94 °C por 2min, seguido por 30 ciclos de 94 °C/1min, 60 °C/1min e 72 °C/2min, com extensão final de 72 °C por 5min.

Os produtos de RT-PCR obtidos com os pares de *primers* do PCR em tempo real, específicos para as estirpes, foram purificados utilizando-se o kit Wizard® SV Gel e PCR Clean-Up System (Promega). Os fragmentos foram ligados ao vetor pGEM®-T Easy (Promega) e clonados em *Escherichia coli* αDH6, seguindo as indicações dos fabricantes. Os plasmídeos foram extraídos através do método de lise alcalina (Miniprep) e, posteriormente, quantificados com o equipamento NanoVue Plus™ (GE Healthcare) para o cálculo do número de cópias virais/μl de cada estirpe e também para análise de pureza das amostras. Após a quantificação, o número de cópias virais foi calculado utilizando-se a fórmula descrita por Dai et al. (2013):

$$\frac{X \text{ (g/}\mu\text{l)} \times 6 \times 10^{23}}{\text{Comprimento plasmídeo (pb)} \times 660} = Y \text{ cópias virais/}\mu\text{l}$$

Em que:

**X** = quantificação do DNA em g/μl;

**6 × 10<sup>23</sup>** = número de moléculas em 1 mol (constante de Avogadro);

**Comprimento do plasmídeo (pb)** = plasmídeo pGEM®-T Easy (3015pb) + inserto (PED-AX = 125pb ou LUI-AGA = 265pb);

**660** = peso molecular médio de 1 pb de DNA.

Os plasmídeos com índices de pureza mais altos (relações A260/280 e A260/230) foram selecionados para o processo de linearização e posterior composição da curva padrão. O processo de linearização foi realizado através da restrição plasmidial usando a enzima Sall (Fermentas), seguindo as instruções do fabricante. Os plasmídeos linearizados foram purificados com fenol/clorofórmio, conforme recomendado pelo fabricante, adicionando-se a cada 1µl do DNA plasmidial linearizado um volume de 10µl de 3M Acetato de sódio, a mistura foi homogeneizada e, em seguida, extraída por centrifugação com igual volume de fenol/clorofórmio 1:1. O sobrenadante foi transferido para novos tubos e precipitado com igual volume de clorofórmio. Novamente o sobrenadante foi transferido para um novo tubo e a ele foi adicionado duas vezes de seu volume de etanol absoluto, os tubos foram incubados a -20 °C durante 30 min para precipitação do DNA. Após esse período, procedeu-se a centrifugação do material a 12000rpm por 20 minutos. O pellet formado foi lavado em etanol 70% gelado, e posteriormente, ressuspenso em água ultrapura tratada com DEPC. Os plasmídeos linearizados e purificados foram utilizados para a construção da curva padrão da qPCR, oito pontos de diluições seriadas foram preparados englobando concentrações que variaram de  $10^1$  até  $10^9$  cópias virais/µl.

#### **4.3 Extração de RNA, síntese de cDNA e ensaio qPCR**

A extração do RNA total das plantas infectadas, destinado a RT-qPCR, foi realizada conforme já descrito no Item 4.6.

A reação de RT-qPCR foi conduzida em duas etapas separadas, sendo a síntese do cDNA a primeira delas, realizada com a enzima Superscript II Reverse Transcriptase (Invitrogen) e o *primer* Oligo DT (Promega), seguindo a termociclagem já descrita no Item 3.6.



A reação de qPCR utilizando o cDNA recém-sintetizado foi montada para um volume final de 20 $\mu$ l, contendo: 10 $\mu$ l do TaqMan Universal Master Mix II (Applied Biosystems), 0,9 $\mu$ M de cada *primer*, 0,25 $\mu$ M da sonda específica para a estirpe (Tabela 2) a ser detectada e 2 $\mu$ l do cDNA. O equipamento utilizado foi o Eco Real-Time PCR (Illumina) e a termociclagem empregada foi 50 °C por 2 min na etapa de *UDG Incubation*, 95 °C por 10 min para ativação da Polimerase, seguidos por 40 repetições dos ciclos de: 95 °C por 30 segundos e 60 °C por 1 min (para PVY<sup>N:O/N-Wi</sup>) ou 2 min (para PVY<sup>NTN</sup>).

As amostras processadas em triplicatas foram analisadas utilizando o *software* EcoStudy v5.0 (Illumina).

#### **4.4 Validação do RT-qPCR para diagnose de *Potato virus Y***

A validação do processo de detecção via RT-PCR em tempo real foi realizada comparando-se os resultados obtidos pelos métodos de RT-PCR multiplex (convencional) e os resultados do teste TAS-ELISA aos resultados obtidos com o RT-PCR em tempo real tanto para as amostras controle quanto para as desconhecidas.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Sintomas observados nas plantas de batata provenientes dos tubérculos infectados

As 39 amostras de São Gotardo, constituídas por folhas que apresentaram resultado positivo para PVY quando foram analisadas no CIV-MG, foram coletadas no final do ciclo, de modo que pelo estágio de quase senescência das plantas não permitiram uma avaliação dos sintomas. Sendo de um campo de sementes, provavelmente foram infectadas no final da estação corrente, e continham uma baixa porcentagem de partículas virais, não apresentando sintomas.

As 126 amostras restantes foram provenientes dos tubérculos que apresentaram resultado positivo para PVY por DAS-ELISA. Os sintomas apresentados por elas foram classificados em mosaico forte e redução da área foliar (Mo+++/RF), mosaico forte (Mo+++), mosaico médio (Mo++) e mosaico leve (Mo+) (Figura 1). Entre as 53 plantas oriundas dos tubérculos de batata produzidos em Ouro Fino, quatro não apresentaram sintomas aparentes, quatro apresentaram mosaico forte mais redução foliar, cinco apresentaram apenas mosaico forte, treze apresentaram mosaico médio e a maioria, vinte e sete plantas, apresentou apenas mosaico leve (Tabela 3). Experimentos realizados por Ramalho (2012) mostraram que isolados de PVY<sup>N:O/N-Wi</sup> e de PVY<sup>NTN</sup> não induziram sintomas em plantas da cv. Ágata em infecções primárias, ou seja, quando a planta é infectada na estação corrente. Sintomas com diferentes intensidades somente apareceram em infecções secundárias, na segunda e terceira geração quando a planta estava infectada com PVY<sup>NTN</sup>, mas em alguns casos os isolados de PVY<sup>N:O/N-Wi</sup> não induziram sintomas aparentes até a terceira geração.

Das cinquenta e duas plantas originadas dos tubérculos produzidos em Maria da Fé, dez apresentaram mosaico forte, treze apresentaram

mosaico médio e novamente a maioria, ou seja, vinte e nove, apresentou mosaico leve. Em Cristina, entre as dez plantas avaliadas, uma apresentava mosaico forte, duas apresentaram mosaico médio e sete apresentaram mosaico leve. Finalmente, das onze plantas obtidas a partir dos tubérculos provenientes dos supermercados e verdurões locais, três apresentaram mosaico médio e oito apresentaram mosaico leve. A maioria das amostras com sintomas mais acentuados (mosaico médio e forte) apresentou sorologia positiva para PVY<sup>N</sup> quer seja em infecções simples ou mistas.

A intensidade e o aspecto dos sintomas observados em plantas de batata variam consideravelmente entre cultivares, e geralmente estão associados ao estágio no qual estas plantas foram infectadas e a estirpe de PVY envolvida na infecção, bem como as condições ambientais em que essas plantas se encontravam no campo. Podem surgir além de mosaico, outros sintomas, tais como: lesões necróticas, amarelecimento sistêmico e necrose internerval (KARASEV; GRAY, 2013; KERLAN; LE ROMANCER, 1999). Além disso, a estirpe PVY<sup>NTN</sup> é reconhecida por induzir anéis necróticos (PTNRD) nos tubérculos de cultivares de batata suscetível, afetando diretamente a qualidade da produção (BALDAUF; GRAY; PERRY, 2006; LE-ROMANCER; NEDELLEC, 1997; MCDONALD; SINGH, 1996). Entretanto, a cultivar Ágata tem se mostrado aparentemente uma exceção as demais cultivares por não apresentar sintomas foliares, ou anéis nos tubérculos, quando infectada por esta estirpe. As infecções tardias na planta também não induzem perdas significativas na produção, embora os vírus possam se translocar para os tubérculos, geralmente ocasionando a degenerescência da semente em plantios sucessivos (BOONHAM et al., 2002; COSTA et al., 2010; KARASEV; GRAY, 2013).

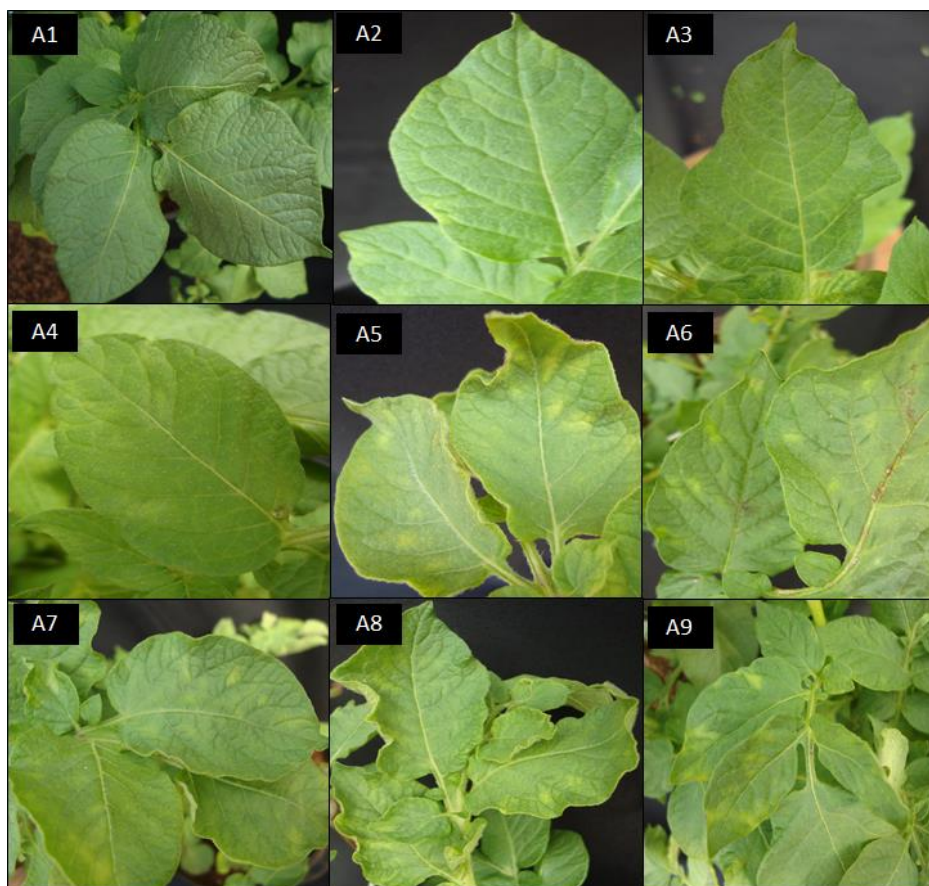


Figura 1 Padrões de sintomas apresentados pelas plantas de batata provenientes dos tubérculos plantados: A1) Controle negativo: Planta de batata sadia; A2 e A3) MO+: 609/5 e CMF92; A4) MO++: S4; A5, A6 e A7) Mo+++ : 610/35, CMF1 e 608/84; A8 e A9) MO+++/RF: 611/33, 608/63.

Tabela 3 Origem e denominação dos isolados analisados, sintomas induzidos nas plantas de batata e resultado da análise por TAS-ELISA e por RT-PCR

Isolado	Origem	Cultivar	Sintomas	Resultados obtidos quando as amostras foram analisadas por TAS-ELISA, usando os anticorpos indicados				Possível (is) Estirpe(s)	Resultados obtidos por RT-PCR Multiplex
				Anticorpos					
				AGDIA		SASA			
				1F5	MAb2	SN	SO		
618.1/1	São Gotardo	Ágata	S/SA	-	+	-	-	Y <sup>O/N-Wi</sup>	N:O/N-Wi
618.1/3	São Gotardo	Ágata	S/SA	+	+	+	+	Y <sup>N/NTN</sup> +Y <sup>O/N:Wi</sup>	N:O/N-Wi +NTN
618.1/4	São Gotardo	Ágata	S/SA	+	-	+	-	Y <sup>N/NTN</sup>	NTN
618.1/11	São Gotardo	Ágata	S/SA	+	+	+	+	Y <sup>N/NTN</sup> +Y <sup>O/N:Wi</sup>	N:O/N-Wi +NTN
618.1/18	São Gotardo	Ágata	S/SA	-	-	-	-	-	NTN
618.1/24	São Gotardo	Ágata	S/SA	+	+	+	+	Y <sup>N/NTN</sup> +Y <sup>O/N:Wi</sup>	N:O/N-Wi +NTN
618.1/25	São Gotardo	Ágata	S/SA	-	+	-	-	Y <sup>O/N-Wi</sup>	N:O/N-Wi
619.1/2	São Gotardo	Ágata	S/SA	-	+	-	-	Y <sup>O/N-Wi</sup>	N:O/N-Wi
619.1/3	São Gotardo	Ágata	S/SA	+	-	+	-	Y <sup>N/NTN</sup>	NTN
619.1/4	São Gotardo	Ágata	S/SA	+	-	+	-	Y <sup>N/NTN</sup>	NTN
619.1/5	São Gotardo	Ágata	S/SA	+	-	+	-	Y <sup>N/NTN</sup>	NTN
619.1/6	São Gotardo	Ágata	S/SA	+	-	+	-	Y <sup>N/NTN</sup>	NTN
619.1/7	São Gotardo	Ágata	S/SA	+	+	+	+	Y <sup>N/NTN</sup> +Y <sup>O/N:Wi</sup>	N:O/N-Wi +NTN
619.1/9	São Gotardo	Ágata	S/SA	+	-	+	-	Y <sup>N/NTN</sup>	NTN
619.1/10	São Gotardo	Ágata	S/SA	-	+	-	-	Y <sup>O/N-Wi</sup>	N:O/N-Wi
619.1/11	São Gotardo	Ágata	S/SA	+	+	+	+	Y <sup>N/NTN</sup> +Y <sup>O/N:Wi</sup>	N:O/N-Wi +NTN
619.1/13	São Gotardo	Ágata	S/SA	-	+	-	-	Y <sup>O/N-Wi</sup>	N:O/N-Wi
619.2/1	São Gotardo	Ágata	S/SA	+	+	+	+	Y <sup>N/NTN</sup> +Y <sup>O/N:Wi</sup>	N:O/N-Wi +NTN
619.2/2	São Gotardo	Ágata	S/SA	+	-	+	+	Y <sup>N/NTN</sup> +Y <sup>O/N:Wi</sup>	N:O/N-Wi +NTN

“Tabela 3, continua”

Isolado	Origem	Cultivar	Sintomas	Resultados obtidos quando as amostras foram analisadas por TAS-ELISA, usando os anticorpos indicados				Possível (is) Estirpe(s)	Resultados obtidos por RT-PCR Multiplex
				Anticorpos					
				AGDIA		SASA			
				1F5	MAb2	SN	SO		
619.2/4	São Gotardo	Ágata	S/SA	+	-	+	-	Y <sup>N/NTN</sup>	NTN
619.2/5	São Gotardo	Ágata	S/SA	+	-	+	-	Y <sup>N/NTN</sup>	NTN
619.2/8	São Gotardo	Ágata	S/SA	-	+	-	+	Y <sup>O/N-Wi</sup>	N:O/N-Wi +NTN
619.2/9	São Gotardo	Ágata	S/SA	-	+	-	-	Y <sup>O/N-Wi</sup>	N:O/N-Wi+NTN
622.2/6	São Gotardo	Ágata	S/SA	-	-	-	-	-	NTN
622.2/8	São Gotardo	Ágata	S/SA	+	-	+	+	Y <sup>N/NTN</sup> +Y <sup>O/N:Wi</sup>	N:O/N-Wi +NTN
622.2/9	São Gotardo	Ágata	S/SA	-	-	-	-	-	N:O/N-Wi +NTN
622.2/12	São Gotardo	Ágata	S/SA	-	-	-	-	-	NTN
622.2/13	São Gotardo	Ágata	S/SA	-	-	-	-	-	NTN
622.2/15	São Gotardo	Ágata	S/SA	-	-	-	-	-	NTN
622.2/16	São Gotardo	Ágata	S/SA	+	+	+	+	Y <sup>N/NTN</sup> +Y <sup>O/N:Wi</sup>	N:O/N-Wi +NTN
622.2/17	São Gotardo	Ágata	S/SA	+	+	+	+	Y <sup>N/NTN</sup> +Y <sup>O/N:Wi</sup>	N:O/N-Wi +NTN
623.3/4	São Gotardo	Ágata	S/SA	-	+	-	-	Y <sup>O/N-Wi</sup>	N:O/N-Wi
623.3/12	São Gotardo	Ágata	S/SA	-	-	-	-	-	NTN
623.3/16	São Gotardo	Ágata	S/SA	-	+	-	-	Y <sup>O/N-Wi</sup>	N:O/N-Wi
624.3/6	São Gotardo	Ágata	S/SA	+	+	+	+	Y <sup>N/NTN</sup> +Y <sup>O/N:Wi</sup>	N:O/N-Wi +NTN
624.3/8	São Gotardo	Ágata	S/SA	-	+	-	-	Y <sup>O/N-Wi</sup>	N:O/N-Wi
624.3/15	São Gotardo	Ágata	S/SA	+	+	+	+	Y <sup>N/NTN</sup> +Y <sup>O/N:Wi</sup>	N:O/N-Wi +NTN
624.3/18	São Gotardo	Ágata	S/SA	+	+	+	+	Y <sup>N/NTN</sup> +Y <sup>O/N:Wi</sup>	N:O/N-Wi +NTN
624.3/24	São Gotardo	Ágata	S/SA	+	-	+	+	Y <sup>N/NTN</sup> +Y <sup>O/N:Wi</sup>	N:O/N-Wi +NTN
608/57	Ouro Fino	Ágata	MO+	-	+	-	+	Y <sup>O/N-Wi</sup>	N:O/N-Wi

“Tabela 3, continua”

Isolado	Origem	Cultivar	Sintomas	Resultados obtidos quando as amostras foram analisadas por TAS-ELISA, usando os anticorpos indicados				Possível (is) Estirpe(s)	Resultados obtidos por RT-PCR Multiplex
				Anticorpos					
				AGDIA		SASA			
				1F5	MAb2	SN	SO		
608/63	Ouro Fino	Ágata	MO+++/RF	+	-	+	-	Y <sup>N/NTN</sup>	NTN
608/84	Ouro Fino	Ágata	MO+++	+	-	+	-	Y <sup>N/NTN</sup>	NTN
608/100	Ouro Fino	Ágata	MO+++	+	-	+	-	Y <sup>N/NTN</sup>	NTN
609/1	Ouro Fino	Ágata	MO+++	+	-	+	-	Y <sup>N/NTN</sup>	NTN
609/2	Ouro Fino	Ágata	MO++	+	-	+	-	Y <sup>N/NTN</sup>	NTN
609/5	Ouro Fino	Ágata	MO+	-	+	-	+	Y <sup>O/N-WI</sup>	N:O/N-Wi
609/8	Ouro Fino	Ágata	MO++	+	-	+	-	Y <sup>N/NTN</sup>	NTN
609/11	Ouro Fino	Ágata	MO+	-	+	-	+	Y <sup>O/N-WI</sup>	N:O/N-Wi
609/12	Ouro Fino	Ágata	MO+	-	+	-	+	Y <sup>O/N-WI</sup>	N:O/N-Wi
609/32	Ouro Fino	Ágata	MO++	+	-	+	-	Y <sup>N/NTN</sup>	NTN
609/41	Ouro Fino	Ágata	MO+	+	-	+	-	Y <sup>N/NTN</sup>	NTN
609/49	Ouro Fino	Ágata	MO+	+	-	+	-	Y <sup>N/NTN</sup>	NTN
609/61	Ouro Fino	Ágata	MO+	-	+	-	+	Y <sup>O/N-WI</sup>	N:O/N-Wi
609/65	Ouro Fino	Ágata	MO+++/RF	+	-	+	-	Y <sup>N/NTN</sup>	NTN
609/68	Ouro Fino	Ágata	MO+	-	+	-	+	Y <sup>O/N-WI</sup>	N:O/N-Wi
609/77	Ouro Fino	Ágata	MO+	+	-	+	-	Y <sup>N/NTN</sup>	NTN
609/93	Ouro Fino	Ágata	MO++	-	+	-	+	Y <sup>O/N-WI</sup>	N:O/N-Wi
610/1	Ouro Fino	Ágata	MO++	+	-	+	-	Y <sup>N/NTN</sup>	NTN
610/5	Ouro Fino	Ágata	MO++	+	-	+	-	Y <sup>N/NTN</sup>	NTN
610/14	Ouro Fino	Ágata	MO++	+	-	+	-	Y <sup>N/NTN</sup>	NTN
610/22	Ouro Fino	Ágata	MO	-	+	-	+	Y <sup>O/N-WI</sup>	N:O/N-Wi

“Tabela 3, continua”

Isolado	Origem	Cultivar	Sintomas	Resultados obtidos quando as amostras foram analisadas por TAS-ELISA, usando os anticorpos indicados				Possível (is) Estirpe(s)	Resultados obtidos por RT-PCR Multiplex
				Anticorpos					
				AGDIA		SASA			
				1F5	MAb2	SN	SO		
610/27	Ouro Fino	Ágata	S/SA	+	-	-	-	Y <sup>N/NTN</sup>	NTN
610/33	Ouro Fino	Ágata	MO+	+	-	+	-	Y <sup>N/NTN</sup>	NTN
610/34	Ouro Fino	Ágata	MO+	-	+	-	+	Y <sup>O/N-Wi</sup>	N:O/N-Wi+NTN
610/35	Ouro Fino	Ágata	MO+++	+	-	+	-	Y <sup>N/NTN</sup>	NTN
610/41	Ouro Fino	Ágata	MO++	+	-	+	-	Y <sup>N/NTN</sup>	NTN
610/42	Ouro Fino	Ágata	MO+	+	-	+	-	Y <sup>N/NTN</sup>	NTN
610/44	Ouro Fino	Ágata	MO+	+	-	+	-	Y <sup>N/NTN</sup>	NTN
610/51	Ouro Fino	Ágata	MO++	+	-	+	-	Y <sup>N/NTN</sup>	NTN
610/56	Ouro Fino	Ágata	MO+	+	-	+	-	Y <sup>N/NTN</sup>	NTN
610/57	Ouro Fino	Ágata	MO+	+	-	+	-	Y <sup>N/NTN</sup>	NTN
610/69	Ouro Fino	Ágata	MO+++/RF	+	+	+	+	Y <sup>N/NTN</sup> +Y <sup>O/N:Wi</sup>	N:O/N-Wi +NTN
610/77	Ouro Fino	Ágata	MO+++	+	-	+	-	Y <sup>N/NTN</sup>	NTN
610/82	Ouro Fino	Ágata	MO+	-	+	-	+	Y <sup>O/N-Wi</sup>	N:O/N-Wi +NTN
610/89	Ouro Fino	Ágata	MO+	+	-	+	-	Y <sup>N/NTN</sup>	N:O/N-Wi +NTN
610/93	Ouro Fino	Ágata	MO+	-	+	-	+	Y <sup>O/N-Wi</sup>	N:O/N-Wi
610/94	Ouro Fino	Ágata	MO++	+	+	+	+	Y <sup>N/NTN</sup> +Y <sup>O/N:Wi</sup>	N:O/N-Wi +NTN
610/95	Ouro Fino	Ágata	MO+	+	-	+	-	Y <sup>N/NTN</sup>	NTN
610/98	Ouro Fino	Ágata	S/SA	-	-	-	-	-	N:O/N-Wi +NTN
610/100	Ouro Fino	Ágata	MO+	-	+	-	+	Y <sup>O/N-Wi</sup>	N:O/N-Wi
611/33	Ouro Fino	Ágata	MO+++/RF	+	+	+	+	Y <sup>N/NTN</sup> +Y <sup>O/N:Wi</sup>	N:O/N-Wi +NTN
612/4	Ouro Fino	Ágata	MO+	-	+	-	+	Y <sup>O/N-Wi</sup>	N:O/N-Wi



“Tabela 3, continua”

Isolado	Origem	Cultivar	Sintomas	Resultados obtidos quando as amostras foram analisadas por TAS-ELISA, usando os anticorpos indicados				Possível (is) Estirpe(s)	Resultados obtidos por RT-PCR Multiplex
				Anticorpos					
				AGDIA		SASA			
				1F5	MAb2	SN	SO		
612/6	Ouro Fino	Ágata	MO+	+	-	+	-	Y <sup>N/NTN</sup>	N:O/N-Wi +NTN
612/27	Ouro Fino	Ágata	MO+	+	-	+	-	Y <sup>N/NTN</sup>	NTN
612/34	Ouro Fino	Ágata	MO+	+	-	+	-	Y <sup>N/NTN</sup>	NTN
612/46	Ouro Fino	Ágata	MO+	-	+	-	+	Y <sup>O/N-Wi</sup>	N:O/N-Wi
612/56	Ouro Fino	Ágata	MO++	+	-	+	-	Y <sup>N/NTN</sup>	NTN
612/57	Ouro Fino	Ágata	MO+	-	+	-	+	Y <sup>O/N-Wi</sup>	N:O/N-Wi
612/59	Ouro Fino	Ágata	S/SA	+	-	+	-	Y <sup>N/NTN</sup>	NTN
612/73	Ouro Fino	Ágata	S/SA	-	-	-	-	-	N:O/N-Wi +NTN
612/76	Ouro Fino	Ágata	MO++	+	-	+	-	Y <sup>N/NTN</sup>	NTN
612/86	Ouro Fino	Ágata	MO++	+	-	+	-	Y <sup>N/NTN</sup>	NTN
CMF1	Maria da Fé	Caesar	MO+++	+	+	+	+	Y <sup>N/NTN</sup> + Y <sup>O/N:Wi</sup>	N:O/N-Wi +NTN
CMF2	Maria da Fé	Caesar	MO+++	-	+	-	+	Y <sup>O/N-Wi</sup>	N:O/N-Wi
CMF9	Maria da Fé	Caesar	MO++	-	+	-	+	Y <sup>O/N-Wi</sup>	N:O/N-Wi
CMF10	Maria da Fé	Caesar	MO++	-	+	-	+	Y <sup>O/N-Wi</sup>	N:O/N-Wi
CMF18	Maria da Fé	Caesar	MO++	-	+	-	+	Y <sup>O/N-Wi</sup>	N:O/N-Wi
CMF19	Maria da Fé	Caesar	MO++	-	+	-	+	Y <sup>O/N-Wi</sup>	N:O/N-Wi
CMF20	Maria da Fé	Caesar	MO++	-	+	-	+	Y <sup>O/N-Wi</sup>	N:O/N-Wi
CMF21	Maria da Fé	Caesar	MO+	-	+	-	+	Y <sup>O/N-Wi</sup>	N:O/N-Wi
CMF22	Maria da Fé	Caesar	MO+	-	+	-	+	Y <sup>O/N-Wi</sup>	N:O/N-Wi
CMF24	Maria da Fé	Caesar	MO+	-	+	-	+	Y <sup>O/N-Wi</sup>	N:O/N-Wi
CMF33	Maria da Fé	Caesar	MO++	-	+	-	+	Y <sup>O/N-Wi</sup>	N:O/N-Wi

“Tabela 3, continua”

Isolado	Origem	Cultivar	Sintomas	Resultados obtidos quando as amostras foram analisadas por TAS-ELISA, usando os anticorpos indicados				Possível (is) Estirpe(s)	Resultados obtidos por RT-PCR Multiplex
				Anticorpos					
				AGDIA		SASA			
				1F5	MAb2	SN	SO		
CMF45	Maria da Fé	Caesar	MO++	+	-	+	-	Y <sup>N/NTN</sup>	NTN
CMF46	Maria da Fé	Caesar	MO++	+	-	+	-	Y <sup>N/NTN</sup>	NTN
CMF47	Maria da Fé	Caesar	MO+	-	+	-	+	Y <sup>O/N-Wi</sup>	N:O/N-Wi
CMF48	Maria da Fé	Caesar	MO+++	-	+	-	+	Y <sup>O/N-Wi</sup>	N:O/N-Wi
CMF49	Maria da Fé	Caesar	MO++	-	+	-	+	Y <sup>O/N-Wi</sup>	N:O/N-Wi
CMF50	Maria da Fé	Caesar	MO+++	+	-	+	-	Y <sup>N/NTN</sup>	NTN
CMF51	Maria da Fé	Caesar	MO+	-	+	-	+	Y <sup>O/N-Wi</sup>	N:O/N-Wi
CMF52	Maria da Fé	Caesar	MO+	-	+	-	+	Y <sup>O/N-Wi</sup>	N:O/N-Wi
CMF53	Maria da Fé	Caesar	MO+++	-	+	-	+	Y <sup>O/N-Wi</sup>	N:O/N-Wi
CMF54	Maria da Fé	Caesar	MO+	+	-	+	-	Y <sup>N/NTN</sup>	NTN
CMF55	Maria da Fé	Caesar	MO+	-	+	-	+	Y <sup>O/N-Wi</sup>	N:O/N-Wi
CMF56	Maria da Fé	Caesar	MO+	-	+	-	+	Y <sup>O/N-Wi</sup>	N:O/N-Wi
CMF57	Maria da Fé	Caesar	MO+	-	+	-	+	Y <sup>O/N-Wi</sup>	N:O/N-Wi
CMF59	Maria da Fé	Caesar	MO+++	-	+	-	+	Y <sup>O/N-Wi</sup>	N:O/N-Wi
CMF60	Maria da Fé	Caesar	MO+	-	+	-	+	Y <sup>O/N-Wi</sup>	N:O/N-Wi
CMF61	Maria da Fé	Caesar	MO+	-	+	-	+	Y <sup>O/N-Wi</sup>	N:O/N-Wi
CMF62	Maria da Fé	Caesar	MO+	-	+	-	+	Y <sup>O/N-Wi</sup>	N:O/N-Wi
CMF63	Maria da Fé	Caesar	MO++	+	+	+	+	Y <sup>N/NTN</sup> + Y <sup>O/N:Wi</sup>	N:O/N-Wi + NTN
CMF64	Maria da Fé	Caesar	MO+	-	+	-	+	Y <sup>O/N-Wi</sup>	N:O/N-Wi
CMF65	Maria da Fé	Caesar	MO+	-	+	-	+	Y <sup>O/N-Wi</sup>	N:O/N-Wi
CMF66	Maria da Fé	Caesar	MO+	+	-	+	-	Y <sup>N/NTN</sup>	NTN

“Tabela 3, continua”

Isolado	Origem	Cultivar	Sintomas	Resultados obtidos quando as amostras foram analisadas por TAS-ELISA, usando os anticorpos indicados				Possível (is) Estirpe(s)	Resultados obtidos por RT-PCR Multiplex
				Anticorpos					
				AGDIA		SASA			
				1F5	MAb2	SN	SO		
CMF67	Maria da Fé	Caesar	MO+++	-	+	-	+	Y <sup>O/N-WI</sup>	N:O/N-Wi
CMF68	Maria da Fé	Caesar	MO+	-	+	-	+	Y <sup>O/N-WI</sup>	N:O/N-Wi
CMF69	Maria da Fé	Caesar	MO+	-	+	-	+	Y <sup>O/N-WI</sup>	N:O/N-Wi
CMF70	Maria da Fé	Caesar	MO+	+	-	+	-	Y <sup>N/NTN</sup>	NTN
CMF71	Maria da Fé	Caesar	MO+	-	+	-	+	Y <sup>O/N-WI</sup>	N:O/N-Wi
CMF72	Maria da Fé	Caesar	MO+	+	-	+	-	Y <sup>N/NTN</sup>	NTN
CMF73	Maria da Fé	Caesar	MO+	-	+	-	+	Y <sup>O/N-WI</sup>	N:O/N-Wi
CMF74	Maria da Fé	Caesar	MO+	-	+	-	+	Y <sup>O/N-WI</sup>	N:O/N-Wi
CMF75	Maria da Fé	Caesar	MO+	-	+	-	+	Y <sup>O/N-WI</sup>	N:O/N-Wi
CMF76	Maria da Fé	Caesar	MO+++	-	+	-	+	Y <sup>O/N-WI</sup>	N:O/N-Wi
CMF77	Maria da Fé	Caesar	MO+	+	+	+	+	Y <sup>N/NTN</sup> + Y <sup>O/N:Wi</sup>	N:O/N-Wi + NTN
CMF78	Maria da Fé	Caesar	MO+	-	+	-	+	Y <sup>O/N-WI</sup>	N:O/N-Wi
CMF79	Maria da Fé	Caesar	MO+++	-	+	-	+	Y <sup>O/N-WI</sup>	N:O/N-Wi
CMF80	Maria da Fé	Caesar	MO++	-	+	-	+	Y <sup>O/N-WI</sup>	N:O/N-Wi
CMF81	Maria da Fé	Caesar	MO++	-	+	-	+	Y <sup>O/N-WI</sup>	N:O/N-Wi
CMF82	Maria da Fé	Caesar	MO+++	-	+	-	+	Y <sup>O/N-WI</sup>	N:O/N-Wi
CMF83	Maria da Fé	Caesar	MO+	-	+	-	+	Y <sup>O/N-WI</sup>	N:O/N-Wi
CMF84	Maria da Fé	Caesar	MO++	-	+	-	+	Y <sup>O/N-WI</sup>	N:O/N-Wi
CMF87	Maria da Fé	Caesar	MO+	-	+	-	+	Y <sup>O/N-WI</sup>	N:O/N-Wi
CMF99	Maria da Fé	Caesar	MO+	-	+	-	+	Y <sup>O/N-WI</sup>	N:O/N-Wi
CMF36	Cristina	Caesar	MO+	-	+	-	+	Y <sup>O/N-WI</sup>	N:O/N-Wi

“Tabela 3, conclusão”

Isolado	Origem	Cultivar	Sintomas	Resultados obtidos quando as amostras foram analisadas por TAS-ELISA, usando os anticorpos indicados				Possível (is) Estirpe(s)	Resultados obtidos por RT-PCR Multiplex
				Anticorpos					
				AGDIA		SASA			
				1F5	MAb2	SN	SO		
CMF39	Cristina	Caesar	MO++	-	+	-	+	Y <sup>O/N-WI</sup>	N:O/N-Wi
CMF41	Cristina	Caesar	MO+	-	+	-	+	Y <sup>O/N-WI</sup>	N:O/N-Wi
CMF42	Cristina	Caesar	MO+++	-	+	-	+	Y <sup>O/N-WI</sup>	N:O/N-Wi
CMF44	Cristina	Caesar	MO++	-	+	-	+	Y <sup>O/N-WI</sup>	N:O/N-Wi
CMF89	Cristina	Caesar	MO+	+	-	+	-	Y <sup>N/NTN</sup>	NTN
CMF91	Cristina	Caesar	MO+	-	+	-	+	Y <sup>O/N-WI</sup>	N:O/N-Wi
CMF92	Cristina	Caesar	MO+	-	+	-	+	Y <sup>O/N-WI</sup>	N:O/N-Wi
CMF94	Cristina	Caesar	MO+	+	-	+	-	Y <sup>N/NTN</sup>	NTN
CMF98	Cristina	Caesar	MO+	-	+	-	+	Y <sup>O/N-WI</sup>	N:O/N-Wi
S1	Mercados e Feiras	Ágata	MO+	-	-	-	-	-	NTN
S3	Mercados e Feiras	Ágata	MO+	-	-	-	-	-	NTN
S4	Mercados e Feiras	Ágata	MO++	+	-	+	-	Y <sup>N/NTN</sup>	NTN
S5	Mercados e Feiras	Ágata	MO++	+	-	+	-	Y <sup>N/NTN</sup>	NTN
S6	Mercados e Feiras	Ágata	MO+	-	-	-	-	-	NTN
S7	Mercados e Feiras	Ágata	MO+	+	-	+	-	Y <sup>N/NTN</sup>	NTN
S8	Mercados e Feiras	Ágata	MO++	+	-	+	-	Y <sup>N/NTN</sup>	NTN
S11	Mercados e Feiras	Ágata	MO+	-	+	-	+	Y <sup>O/N-WI</sup>	N:O/N-Wi
S15	Mercados e Feiras	Ágata	MO+	-	-	-	-	-	N:O/N-Wi +NTN
S16	Mercados e Feiras	Ágata	MO+	-	+	-	+	Y <sup>O/N-WI</sup>	N:O/N-Wi
S17	Mercados e Feiras	Ágata	MO+	-	-	-	-	-	N:O/N-Wi +NTN

\*S/SA: sem sintomas aparentes; MO=Mosaico; Intensidade: Fraco (+), Médio (++), Forte (+++); RF=Redução foliar.

## 5.2 Resultados obtidos no TAS-ELISA

Do total das amostras analisadas, 46,1% delas mostraram comportamento sorológico compatível com estirpes pertencentes ao grupo de sorotipo O, enquanto 34,5% foram compatíveis com estirpes pertencentes ao sorotipo N. Associadas ao sorotipo O existem, até o momento, duas principais estirpes de PVY: a estirpe comum PVY<sup>O</sup> (parental) e a estirpe recombinante PVY<sup>N:O/N-Wi</sup>, conhecida como estirpe Wilga. Por outro lado, para as estirpes de PVY com sorotipo N são descritas a estirpe parental PVY<sup>N</sup> e as estirpes recombinantes PVY<sup>NTN</sup>, PVY<sup>E</sup>, PVY-NE-11, PVY<sup>NA-N</sup>, entre outras. Do restante das amostras 13,9% foram detectadas para ambos os sorotipos O e N, caracterizando infecções mistas.

Entretanto, algumas amostras DAS-ELISA positivas mostraram resultado negativo no TAS-ELISA, perfazendo 5,5% do total analisado, sendo elas: S1, S3, S6, S15 e S17 de estabelecimentos revendedores, 610/98 e 612/73 de Ouro Fino, e 618.1/18, 622.2/6, 622.2/9, 622.2/12, 622.2/13, 622.2/15, 623.3/12 de São Gotardo. Isso pode ter ocorrido devido ao fato de as concentrações das estirpes virais estarem abaixo do limite de sensibilidade dessa técnica, uma vez que, ao serem posteriormente analisadas por RT-PCR, essas mesmas amostras se mostraram positivas para uma ou mais das estirpes investigadas (Gráfico 1).

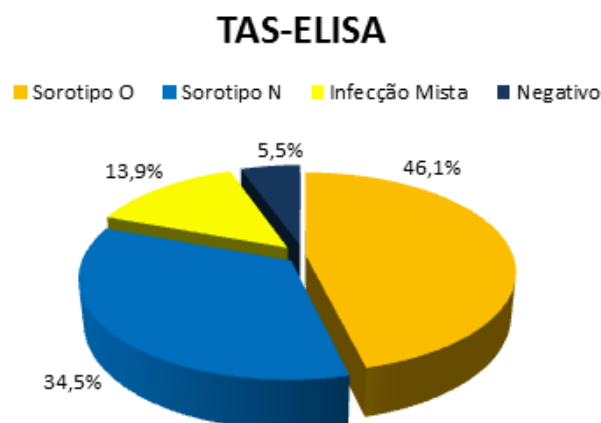


Gráfico 1 Perfil sorológico dos isolados de PVY analisados por TAS-ELISA.

De um modo geral, as amostras com sorotipo O foram positivas apenas para os anticorpos MAb2 e SASA-O, que detectam as estirpes comum e Wilga, e posteriormente estas foram identificadas por RT-PCR multiplex como pertencendo à estirpe Wilga, com raras exceções. Das 39 amostras de São Gotardo, 10 reagiram com um ou com ambos desses anticorpos, destas 8 amplificaram as bandas de PVY<sup>N:O/N-Wi</sup>, enquanto que as outras duas apresentaram infecção mista amplificando o padrão de bandas das estirpes Wilga e NTN. Das 53 amostras provenientes de Ouro fino, 15 apresentaram sorotipo O, sendo que 13 foram identificadas como Wilga e 2 apresentaram infecções mistas com as mesmas duas estirpes na RT-PCR multiplex. Das 52 amostras provenientes de Maria de Fé, 42 apresentaram sorotipo O e todas as 42 foram posteriormente identificadas como sendo a estirpe Wilga. Já entre as 10 amostras do município de Cristina, oito delas apresentaram o sorotipo O, sendo subsequentemente confirmadas como estirpe Wilga. Enquanto nas 11 amostras coletadas nos mercados, as 2 amostras que apresentaram sorotipo O, foram identificadas como Wilga.

De modo semelhante, a maioria das amostras com sorotipo N, foi posteriormente identificada como pertencendo à estirpe NTN por RT-PCR multiplex. Dentre as amostras de São Gotardo, 8 apresentaram sorotipo N e foram identificadas como NTN. Já entre as 33 amostras de Ouro Fino que apresentaram sorotipo N, 31 delas foram identificadas como NTN e 2 com infecção mista NTN + Wilga. As sete amostras de Maria da Fé e duas de Cristina, que apresentaram sorotipo N foram posteriormente identificadas como NTN. O mesmo aconteceu com 4 das amostras coletadas nas gôndolas dos mercados.

Todas as amostras que reagiram tanto com os antissoros do grupo O como com os do grupo N foram confirmadas como infecção mista na RT-PCR multiplex com as duas estirpes já citadas: 14 de São Gotardo, 3 de Ouro Fino e 3 de Maria da Fé. Entre as amostras que foram soronegativas, 6 de São Gotardo foram identificadas como NTN e uma com infecção mista; nas amostras de Ouro Fino 2 apresentaram infecção mista e nas 5 negativas entre

as coletadas nos mercados, 3 estavam infectadas com NTN e duas apresentaram infecção mista. Não houve amostra soronegativa entre as provenientes de Maria da Fé. Estas amostras junto àquelas que haviam sido inicialmente caracterizadas como infecções simples e que posteriormente foram identificadas como infecção mista no RT-PCR multiplex, totalizaram 32 amostras. As absorvâncias obtidas em cada um dos testes TAS-ELISA realizados estão representadas nos gráficos 2 a 5.

É interessante observar que existe uma tendência de haver predominância de determinada estirpe em campos diferentes de produção. Em São Gotardo 35,9% dos isolados pertenciam à estirpe NTN, contra 20,51% da estirpe Wilga. Foi o local onde apresentou a maior incidência de infecção mista (43,59%). Em Ouro fino, 58,49% das amostras foram identificadas como NTN, contra 24,53% da estirpe Wilga e 16,98% infecções mistas entre estas duas estirpes. Já entre as amostras coletadas nos mercados e feiras, a maior parte, ou seja, 63,64% foram identificadas como sendo a estirpe necrótica, contra apenas 18,18% para a estirpe Wilga e infecções mistas. Nos campos de Maria da Fé e Cristina pelo menos 80% dos isolados pertenciam à estirpe Wilga contra apenas 13,5% e 20% de NTN, respectivamente. Isso pode estar ligado ao potencial de inóculo da região, uma vez que foi em Maria da Fé o primeiro relato da introdução dessa estirpe no país (FIGUEIRA, 1999). Outra causa poderia ser também a qualidade da semente com a qual se iniciou o plantio, pois apesar de todos serem lotes de sementes (com exceção do material coletado em Lavras) já pertenciam à terceira ou quarta geração de multiplicação no campo.

Nota-se ainda, que algumas amostras possuíam perfil sorológico incomum. No município de São Gotardo foram identificados seis isolados (618.1/1, 618.1/25, 619.1/2, 619.1/10, 619.1/13 e 619.2/9) apresentando resultados positivos para MAb2, embora negativo para SASA-O. Além destes, os isolados 619.2/2, 622.2/8 e 624.3/24, apresentaram resultados positivos para os anticorpos monoclonais que detectam sorotipo N (1F5 e SASA-N) e o anticorpo SASA-O, enquanto o anticorpo MAb2 foi negativo

no teste. Esse tipo de padrão detectado nos isolados que foram positivos para o anticorpo monoclonal SASA-O e negativo para o MAb2 não foram encontrados na literatura. Nos vírus o perfil sorológico é determinado através de regiões específicas que compõem a proteína capsidial, denominadas epitopo, e em estirpes recombinantes são comuns mutações nessas regiões, impossibilitando o reconhecimento do anticorpo, e assim diminuindo a eficiência de detecção dos testes sorológicos (SHUKLA et al., 1989; SHUKLA; WARD; 1989). Já nas amostras de Ouro Fino o anticorpo monoclonal SASA-N falhou para a detecção do isolado 610/27, enquanto anticorpo monoclonal 1F5 apresentou resultado positivo para o sorotipo N.

Nikolaeva et al. (2012) identificaram alguns epitopos distintos na proteína capsidial dos isolados de PVY, que permitem que estes sejam reconhecidos por anticorpos monoclonais específicos para o sorotipo N, e observaram que a simples substituição de um dos aminoácidos da capa proteica viral na região destes epitopos pode levar a completa perda de reatividade com os anticorpos monoclonais disponíveis no mercado para o teste TAS-ELISA, essa conclusão foi tomada com base nos estudos realizados com o isolado brasileiro PVY-AST (NTN/AST) que reage positivamente para o anticorpo monoclonal 1F5 e negativamente para o anticorpo SASA-N.

Além dessas situações de mudanças genômicas, a ocorrência de escapes em testes sorológicos também é considerada comum em alguns casos, o que resulta em graves problemas, uma vez que, estes tubérculos podem posteriormente servir como fonte de inóculo de vírus para afídeos vetores nas gerações subsequentes, e ainda serem exportados para outras áreas, introduzindo novos recombinantes nelas (SINGH et al., 2003). Além disso, outro fator que influencia diretamente no aumento de estirpes recombinantes no campo é a ocorrência de infecções mistas nos cultivos. Desta forma, amostras apresentando características de infecção mista representaram 12% do total analisado. Para cada um dos campos onde foram detectadas coinfeções o padrão de absorbância para os sorotipos O e N



foram muito próximos, indicando que pode não haver vantagem seletiva durante a competição por replicação entre as estirpes envolvidas, embora alguns autores mencionem ser este um dos motivos para o constante surgimento de novos recombinantes de PVY (KERLAN, 2004; LORENZEN et al., 2006b).

Apesar de os resultados sorológicos não serem suficientes para a identificação das estirpes e dos seus variantes genéticos, eles mostram claramente a grande variabilidade que se nota nos campos de produção de batata, semente de Minas Gerais e, provavelmente, do Brasil.

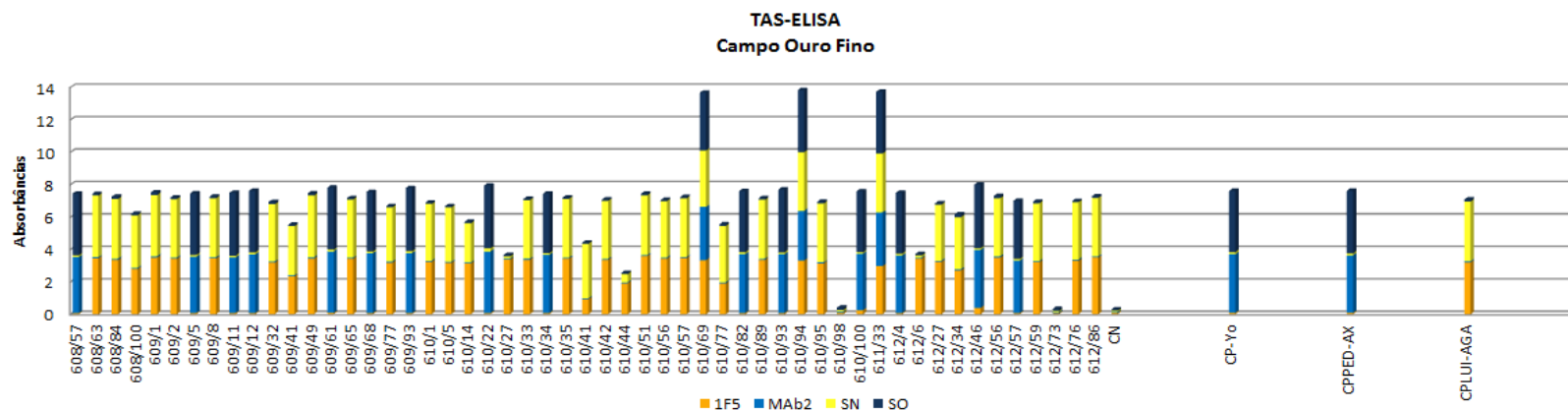


Gráfico 2 Médias das absorvâncias obtidas no teste TAS-ELISA, das amostras provenientes de campos de batata localizados no município de Ouro Fino-MG, utilizando os anticorpos monoclonais 1F5 e SASA-N, Mab2 e SASA-O, capazes de detectar os sorotipos N e O, respectivamente. O valor representado em cada barra indica a somatória das absorvâncias obtidas com os respectivos antissoros

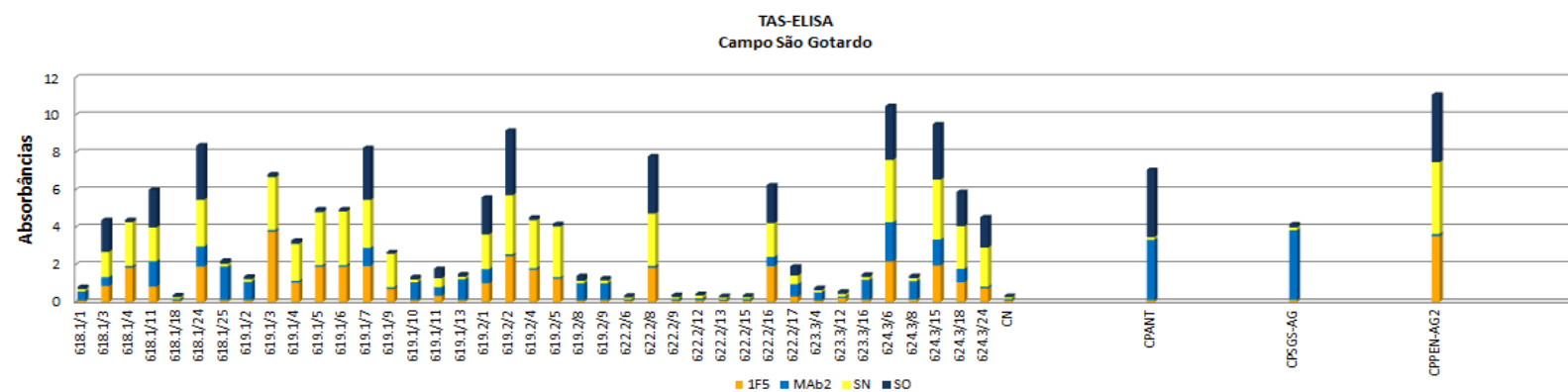


Gráfico 3 Médias das absorvâncias obtidas no teste TAS-ELISA, das amostras provenientes de campos de batata localizados no município de São Gotardo - MG, utilizando os anticorpos monoclonais 1F5 e SASA-N, Mab2 e SASA-O, capazes de detectar os sorotipos N e O, respectivamente. O valor representado em cada barra indica a somatória das absorvâncias obtidas com os respectivos antissoros

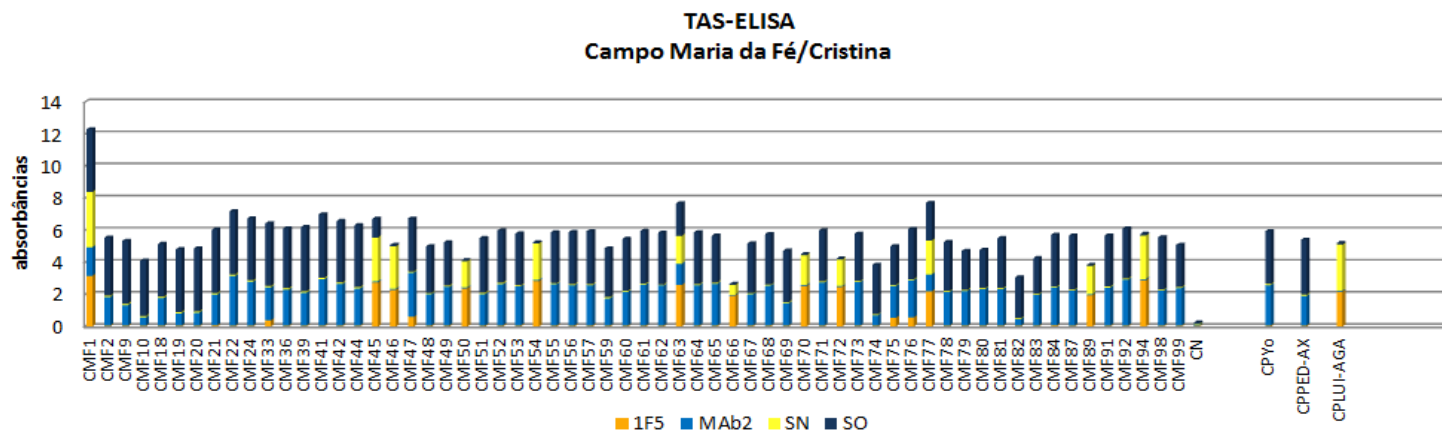


Gráfico 4 Médias das absorvâncias obtidas no teste TAS-ELISA, das amostras provenientes de campos de batata localizados no município de Maria da Fé e Cristina-MG, utilizando os anticorpos monoclonais 1F5 e SASA-N, MAb2 e SASA-O, capazes de detectar os sorotipos N e O, respectivamente. O valor representado em cada barra indica a somatória das absorvâncias obtidas com os respectivos antissoros

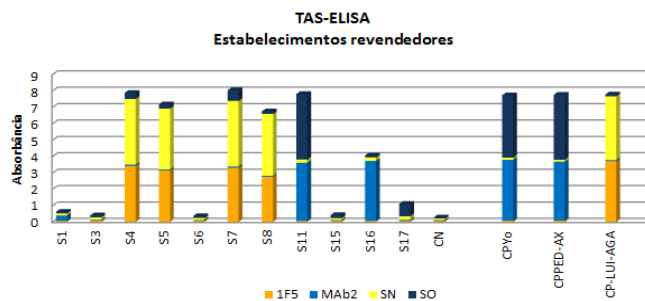


Gráfico 5 Médias das absorvâncias obtidas no teste TAS-ELISA, das amostras provenientes de estabelecimentos revendedores de batata localizados no município de Lavras-MG, utilizando os anticorpos monoclonais 1F5 e SASA-N, MAb2 e SASA-O, capazes de detectar os sorotipos N e O, respectivamente. O valor representado em cada barra indica a somatória das absorvâncias obtidas com os respectivos antissoros

### 5.3 Detecção e distinção de estirpes de PVY por RT-PCR multiplex e esboço da situação epidemiológica destas no campo

O teste da RT-PCR multiplex, utilizando o conjunto de *primers* desenvolvidos por Lorenzen et al. (2006a) mostrou-se eficiente na amplificação do padrão molecular específico das estirpes de PVY que infectavam as plantas analisadas neste estudo.

As plantas de fumo infectadas com estirpes únicas e com misturas serviram como controles no teste de RT-PCR multiplex utilizado, comprovando assim, a eficácia de amplificação do padrão molecular das estirpes de PVY mesmo quando em infecções mistas de duas estirpes recombinantes. As plantas inoculadas com LUI-AGA tiveram as bandas típicas de NTN (452pb e 181pb) amplificadas, ao passo que, as plantas de fumo inoculadas com PED-AX tiveram bandas de 689 e 181pb amplificadas, evidenciando o padrão da estirpe Wilga (LORENZEN et al., 2006a). As plantas inoculadas com ambos os isolados tiveram 3 bandas de diferentes tamanhos amplificadas, sendo elas: 181, 452 e 689 pb, esse mix de bandas é a combinação das bandas típicas de PVY<sup>NTN</sup> e PVY<sup>N:O/Wi</sup>. Todas as 165 amostras de batata foram satisfatoriamente discriminadas por esse teste. Os resultados mostram que do total de amostras analisadas, 73 apresentaram padrão molecular da estirpe Wilga, o que corresponde a 44,2% das amostras analisadas. Sessenta e uma amostras apresentaram padrão molecular da estirpe necrótica, correspondendo a 37%. Finalmente, 31 amostras apresentaram padrão de bandas correspondente a infecção mista das estirpes PVY<sup>NTN</sup> e PVY<sup>N:O/N-Wi</sup>, perfazendo 18,8% do total estudado (Gráfico 6 e Tabela 3). Os padrões moleculares amplificados para cada amostra de batata podem ser observados na figura 2.

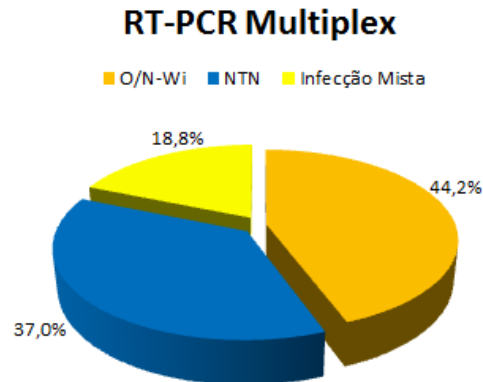


Gráfico 6 Proporção dos grupos de PVY recombinantes analisados por RT-PCR Multiplex

Inicialmente a caracterização de PVY era realizada pela combinação do teste ELISA e a inoculação de plantas indicadoras de fumo e batata. Em seguida, técnicas mais elaboradas, como RT-PCR uniplex e duplex que permitia a distinção de apenas uma ou duas estirpes foram surgindo (BLANCO-URGOITI et al., 1998). Porém a limitação destas técnicas tornou-se evidente com a necessidade de uma diferenciação rápida e prática, conforme os inúmeros variantes genéticos de um mesmo vírus foram sendo descobertos. Desde então, técnicas que permitem caracterizar com precisão todos estes novos variantes têm sido desenvolvidas. Outras metodologias, tais como, RT-PCR multiplex e a RT-qPCR têm oferecido subsídios para tal distinção e, além disso, apresentam maior sensibilidade de detecção (BALME-SINIBALDI et al., 2006; BOONHAM et al., 2002; CHIKH-ALI et al., 2010; FAGERIA et al., 2013; LORENZEN et al., 2006a; NIE, SINGH, 2002).

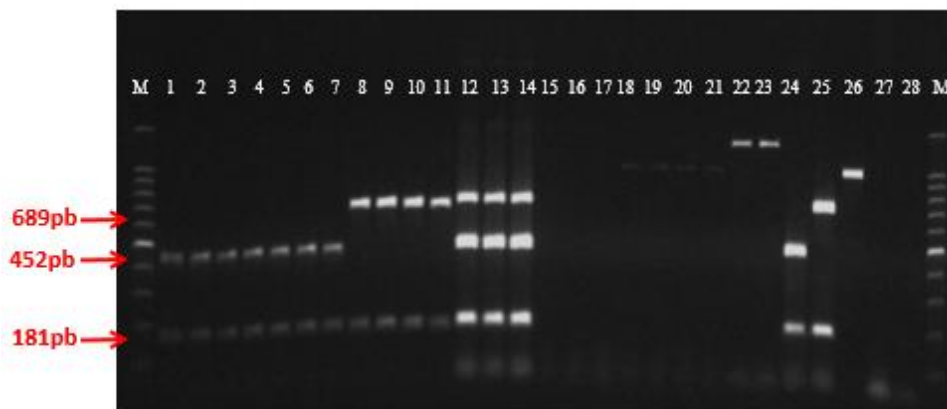


Figura 2 Padrão eletroforético encontrado entre os isolados analisados. M=marcador 100pb; 1) 619.1/3; 2) 618.1/18; 3) S8; 4)608/84; 5) 610/27; 6) S1; 7) CMF46; 8) 618.1/1; 9) 609/5; 10) CMF18; 11) S11; 12) 619.2/2; 13) 610/98; 14) CMF1; 15) 619.1/3; 16) 618.1/18; 17) S8; 18) 608/84; 19) 610/27; 20) S1; 21) 622.2/6; 22) CMF46; 23) CMF50; 24) CP PVY<sup>NTN</sup>=LUI-AGA; 25) CP PVY<sup>N:O/N:Wi</sup>=PED-AX; 26) CP (controle positivo) PVY<sup>E</sup>= AGA-MON; 27) CN (controle negativo) PVY<sup>E</sup>=batata sadia; 28) CN (controle negativo) PVY<sup>NTN</sup> e PVY<sup>N:O/N:Wi</sup>=batata sadia.

De modo geral, os resultados observados no teste RT-PCR multiplex mostraram-se compatíveis com o teste ELISA. As amostras analisadas apresentaram uma predominância da estirpe PVY<sup>N:O/N:Wi</sup>, seguida da estirpe necrótica PVY<sup>NTN</sup>, com poucas infecções mistas. Estes resultados confirmam a vantagem seletiva das estirpes recombinantes no campo, em detrimento das estirpes parentais (PVY<sup>O</sup>, PVY<sup>N</sup>) não recombinantes que, atualmente, quase não são encontradas nos campos produtores de batata do Brasil (RAMALHO, 2012; SANTOS, 2014).

Devido a maior sensibilidade inerente dos testes moleculares, 15 amostras ELISA negativas foram claramente detectadas pelos *primers* utilizados para diferenciar as estirpes na RT-PCR. Esses dados confirmam que escapes podem ocorrer em testes sorológicos e acarretar uma maior incidência viral nos campos de produção futuramente oriundos de sementes falsamente detectadas como livre de vírus, quando na realidade, possuem uma ou mais estirpes de PVY as infectando (WALSH et al., 2001). Diversos autores têm relatado que infecções mistas, com duas ou mais estirpes, podem

ocasionalmente gerar recombinantes com características genômicas novas, e/ou resultar em efeitos sinérgicos, podendo levar a danos mais severos à planta de batata, com conseqüente perda de produção (GALVINO-COSTA et al., 2012a; RAMALHO, 2012; SANTOS, 2014). Desta forma, para o controle da disseminação do PVY nos campos produtores de batata, torna-se necessário o uso de testes cada vez mais sensíveis e confiáveis de detecção.

#### **5.4 Detecção de estirpes de PVY em infecções simples e mistas por RT-qPCR**

O conjunto de *primers* e sondas utilizados nas reações de tempo real foram eficientes para detecção das estirpes virais PVY<sup>NTN</sup> e PVY<sup>N:O/N-Wi</sup> isoladamente, ou seja, em reações no formato uniplex. As análises de regressão das curvas padrão, demonstraram que os testes tiveram alta linearidade ( $y = -4.48x - 3.06$  para PVY<sup>NTN</sup> e PVY<sup>N:O/N-Wi</sup>, respectivamente) e coeficiente de variação ( $r^2 = 0,997$  para PVY<sup>NTN</sup> e  $r^2 = 0,993$  para PVY<sup>N:O/N-Wi</sup>) com eficiência próxima de 1, indicando que estas podem ser utilizadas para quantificar/estimar as concentrações destas estirpes em amostras desconhecidas de forma confiável (Gráfico 7).

Cento e cinquenta e uma amostras foram selecionadas para reação de RT-qPCR, o critério para essa seleção foi analisar todas as amostras classificadas como infecções simples por PVY<sup>NTN</sup> ou PVY<sup>N:O/N-Wi</sup>, e além dessas, analisar também parte das amostras classificadas como coinfeção por essas duas mesmas estirpes nos testes de RT-PCR multiplex feitos neste trabalho. Sendo assim, 17 amostras com coinfeção foram selecionadas aleatoriamente dentre o total de 31 classificadas como tal neste estudo, 61 infecções simples por PVY<sup>NTN</sup> e 73 por PVY<sup>N:O/N-Wi</sup> (Tabela 4) foram testadas nas reações de RT-qPCR com intuito de confirmar as infecções simples e mistas e também avaliar a concentração de cada estirpe nas plantas, inferindo possíveis interações competitivas vantajosas para uma das duas estirpes em questão.

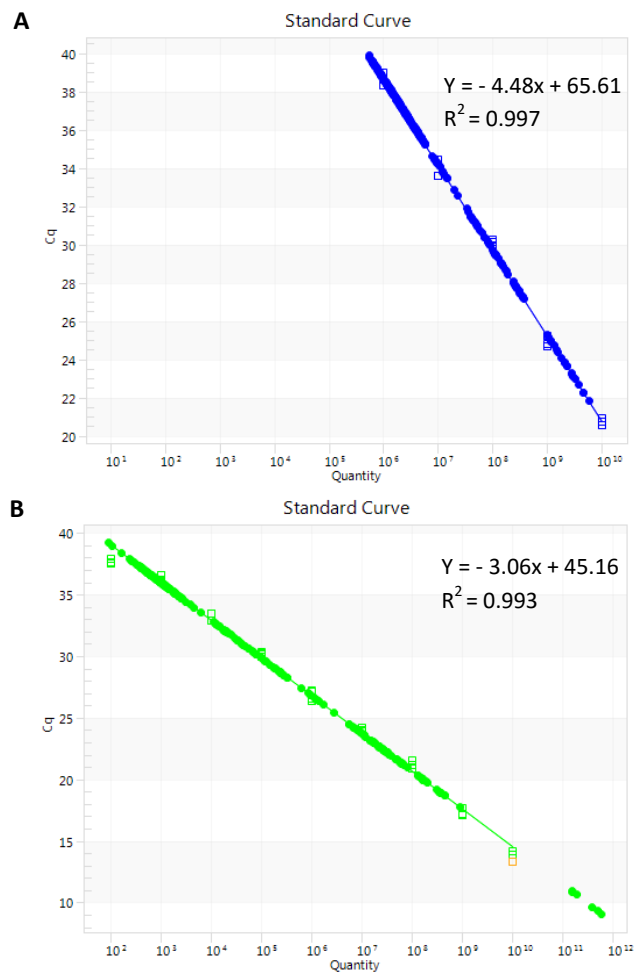


Gráfico 7 Quantificação versus Ct para os pontos da curva padrão de cada reação estirpe-específica da RT-qPCR. As diluições seriadas dos plasmídeos linearizados ( $10^2$  a  $10^{12}$ ) foram testadas em triplicatas e os slopes e coeficiente de variação da curva padrão foram calculados e estão expostos nos gráficos. A) Curva padrão para detecção da estirpe PVY<sup>NTN</sup>. B) Curva padrão para detecção da estirpe PVY<sup>NTN</sup>.

Foram utilizados dois testes RT-qPCR uniplex específicos, um para a detecção da estirpe necrótica e o outro para a estirpe Wilga. Os resultados mostraram que dentre as 73 amostras caracterizadas como PVY<sup>N:O/N-Wi</sup> na RT-PCR multiplex, 38 delas foram confirmadas como sendo infecção simples pela estirpe Wilga, enquanto para as outras 35 detectou-se também infecção pelo PVY<sup>NTN</sup>, indicando assim que as amostras na realidade eram portadoras de infecção mista. Por outro lado, entre as amostras identificadas



previamente como PVY<sup>NTN</sup>, 11 mantiveram o mesmo diagnóstico enquanto as outras 50 foram também positivas, na RT-qPCR, para infecção com a estirpe Wilga, sendo assim caracterizadas como infecções mistas. Já entre as 17 amostras com infecção mista, todas foram confirmadas como tal na RT-qPCR. O índice de amostras portadoras de infecção mista na RT-qPCR foi quatro vezes maior quando comparado aos resultados obtidos no TAS-ELISA e três vezes maior que na RT-PCR multiplex. Estes resultados mostraram claramente que a RT-qPCR possui uma maior sensibilidade e especificidade de detecção das estirpes PVY<sup>NTN</sup> e PVY<sup>N:O/N-Wi</sup> que os outros testes realizados, principalmente quando as concentrações virais na planta encontram-se em quantidades muito baixas, o que torna a técnica viável e com resultados muito superiores aos das outras técnicas utilizadas (BALME-SINIBALDI et al., 2006; FAGERIA et al., 2013).

Após os resultados da RT-qPCR o esboço do cenário epidemiológico das regiões analisadas feito com base na sorologia e RT-PCR mudou, principalmente em relação à incidência de infecções mistas. Com base apenas nos dados de TAS-ELISA e RT-PCR multiplex, o campo de São Gotardo havia apresentado a maior incidência de coinfeções (17 amostras), seguido por Ouro Fino (9), Maria da Fé (3) e Mercados e feiras (2). Já considerando os dados de RT-qPCR, o campo de Ouro Fino aumentou sua incidência geral de coinfeção para 45 amostras dentre as 52 amostras analisadas, sendo que 41 delas foram confirmadas por RT-qPCR evidenciando que a taxa de coinfeção prevaleceu em aproximadamente 86% das amostras oriundas desse campo. O campo de São Gotardo apresentou a segunda maior taxa de coinfeção, aproximadamente 82% das amostras analisadas, sendo 32 amostras com coinfeção das 39 analisadas (24 confirmadas por RT-qPCR). No campo de Maria da Fé, 26 amostras foram detectadas como coinfeção (todas confirmadas por RT-qPCR) dentre as 52 amostras analisadas, perfazendo uma taxa de coinfeção de aproximadamente 50%. No campo de Cristina, das dez amostras coletadas e analisadas seis estavam coinfectadas (confirmadas por RT-qPCR), gerando

uma taxa de 60%. E por fim, dentre as amostras coletadas em Mercados e feiras (11 no total) sete delas apresentaram coinfeção, perfazendo uma taxa de aproximadamente 64% do total analisado para esse local de coleta.

É importante salientar que essas taxas de coinfeção mudaram tanto devido à alta sensibilidade de detecção do teste de RT-qPCR, característica essa já inerente da técnica para detecção de patógenos, porém não antes avaliada para detecção das estirpes do vírus Y no Brasil. Os dados finais mostram que grande parte das amostras antes classificadas como portadoras de infecção simples, por uma das estirpes, através de RT-PCR multiplex, na realidade, estava infectada tanto com PVY<sup>NTN</sup> quanto com PVY<sup>N:O/N-Wi</sup>. Várias hipóteses podem explicar o escape de detecção ocorrido no teste de RT-PCR multiplex, como por exemplo, a infecção das plantas no campo em períodos tardios do ciclo da cultura e, por essa razão, a replicação viral de uma das estirpes teria sido prejudicada, resultando em uma menor concentração de partículas virais na planta. Outra hipótese seria a teoria da vantagem competitiva natural entre as estirpes, dado que elas tenham sido introduzidas na planta ao mesmo tempo ou com intervalos de tempo pequenos, seria possível que uma das duas estirpes apresentasse uma maior habilidade e eficiência na busca por sítios de replicação dentro das células infectadas ao passo a que outra não. Isso resultaria em uma diferença nos níveis de concentração finais de cada estirpe em plantas com coinfeção sistêmica.

Analisando os dados de quantificação de cada estirpe, gerados pelo tempo real (RT-qPCR), evidencia-se, de forma generalista, que nas amostras cujas infecções mistas foram detectadas desde os testes iniciais (sorológicos e RT-PCR) a concentração de partículas da estirpe PVY<sup>NTN</sup> sempre predominou sobre a da estirpe PVY<sup>N:O/N-Wi</sup>, independente do campo de origem de coleta das amostras. As concentrações da estirpe PVY<sup>NTN</sup> nas plantas com coinfeção variaram de  $2,79 \times 10^7$  a  $2,79 \times 10^{10}$  cópias virais/ $\mu$ l. Por outro lado, as concentrações da estirpe PVY<sup>N:O/N-Wi</sup> variaram de  $2,41 \times 10^3$  a  $4,13 \times 10^6$  cópias virais/ $\mu$ l, mostrando significativa diminuição no número

de cópias virais em relação a estirpe PVY<sup>NTN</sup>. Por outro lado, considerando os resultados iniciais de detecção (ELISA e RT-PCR) para as infecções simples, as amostras contendo apenas a estirpe PVY<sup>NTN</sup>, submetidas a RT-qPCR apresentaram quantidades significativas da estirpe Wilga, com a concentração variando entre  $8,64 \times 10^3$  e  $6,67 \times 10^{12}$  cópias virais/ $\mu$ l. Enquanto as amostras com infecções simples que continham a estirpe PVY<sup>N:O/N-Wi</sup>, apresentaram valores de quantificação para a estirpe necrótica variando entre  $2,38 \times 10^7$  e  $1,38 \times 10^{10}$  cópias virais/ $\mu$ l. As amostras analisadas foram consideradas negativas quando apresentaram concentrações superiores ao limite de detecção (controle negativo – água) fixado em  $Cq\ mean=37,50$  e  $Cq\ mean=36,63$  para PVY<sup>NTN</sup> e PVY<sup>N:O/N-Wi</sup>, respectivamente (Tabela 4). Balme-Sinibaldi et al. (2006) desenvolveram um teste de RT-PCR para a detecção de dois grupos específicos de PVY (PVY<sup>O</sup> e PVY<sup>N</sup>), a elevada especificidade destes dois ensaios permitiu a detecção e quantificação confiável e simultânea com limite de detecção de  $10^3$  cópias virais por reação. Neste caso, frações de RNA contendo quantidades iguais de transcritos PVY<sup>O</sup> e PVY<sup>N</sup>, foram eficientemente detectadas e quantificadas com concentrações de  $0,5 \times 10^3$  para PVY<sup>O</sup> e  $2,2 \times 10^3$  para PVY<sup>N</sup>. Por outro lado, quando foram testadas amostras em que as concentrações eram diferentes PVY<sup>N</sup>= $10^3$ /PVY<sup>O</sup>= $10^8$  e PVY<sup>N</sup>  $10^8$ /PVY<sup>O</sup>= $10^3$ , observou-se que as sequências presentes em excesso foram eficientemente quantificadas (PVY<sup>O</sup>= $0,9 \times 10^8$  e PVY<sup>N</sup>= $1,4 \times 10^8$ , respectivamente) os resultados apontam pra alta confiabilidade do teste utilizado.

Outro aspecto a ser considerado é referente à sintomatologia observada entre as plantas de batatas analisadas. Embora os sintomas na cultivar Ágata não sejam muito evidentes, observou-se que do total de amostras que manifestaram os sintomas mais agressivos, tais como, mosaico forte e médio nas plantas de batata analisadas, 62% delas foram identificadas na RT-qPCR como coinfeção pelas estirpes Wilga e NTN, o que pode ser um resultado do efeito sinérgico desse tipo de infecção sobre o hospedeiro (Tabela 3). Análises mais detalhadas de dados de quantificação já obtidos e

estudos de mais amostras oriundas de campos diferentes se fazem necessários para que as hipóteses de interação/competição citadas acima sejam confirmadas ou descartadas, e assim, se alcancem inferências plausíveis sobre as interações entre a estirpe NTN *versus* estirpe Wilga *versus* hospedeira, quando em coinfeção.

Dentre os 61 isolados que apresentaram perfil típico do recombinante PVY<sup>NTN</sup> na RT-PCR multiplex e RT-qPCR, quando submetidos a uma reação de RT-PCR adicional com *primers* específicos para amplificação do PVY<sup>E</sup>, 43 deles apresentaram amplificação de um fragmento 995pb característico dessa estirpe recombinante (Tabela 4). Essa é a primeira vez que se relata esse recombinante em território brasileiro (campo) após a sua descrição em 2012 (GALVINO-COSTA et al., 2012b) e mostra que há um grande indício de que sua disseminação já tenha ocorrido também em outras regiões produtoras de Minas Gerais e até mesmo de outros Estados do país. Essa disseminação é ainda um fato desconhecido, principalmente porque a sua detecção é mais trabalhosa que a das outras estirpes, uma vez que, o PVY<sup>E</sup> é facilmente erroneamente identificado como PVY<sup>NTN</sup> através do método de RT-PCR multiplex (LORENZEN et al., 2006a) mais utilizado pela comunidade científica. É preciso divulgar que um PCR adicional é necessário para identificação do PVY<sup>E</sup> nos campos, conforme já enfatizado no trabalho de descrição desse novo recombinante (GALVINO-COSTA et al., 2012b). Além destes, foram observados 9 isolados com padrões atípicos pertencentes ao campo de Maria da Fé e Cristina, com a amplificação de um fragmento de aproximadamente 1500pb, quando utilizados os mesmos *primers*. A divergência observada nos tamanhos destes fragmentos pode ser atribuída a um possível evento de recombinação ou mutação ocorrido no genoma dos isolados destes campos especificamente, porém tornam-se necessários estudos mais detalhados, como o sequenciamento para a identificação correta destes isolados.

Tabela 4 Resultados comparativos dos métodos de detecção utilizados, dados de quantificação da RT-qPCR para as estirpes analisadas, e resultados da RT-PCR específica para PVY<sup>E</sup>

Isolado	Resultados obtidos no TAS-ELISA: Possível (is) Estirpe(s)	Resultados obtidos por RT-PCR Multiplex	Concentração estimada do número de cópias virais de cada estirpe na RT-qPCR				Resultados da RT-PCR em tempo real	Resultados da RT-PCR para PVY <sup>E</sup>
			Quantificação PVY <sup>NTN</sup>		Quantificação PVY <sup>N:O/N-Wi</sup>			
			(cópias/ul)	Cq mean - PVY <sup>NTN</sup>	(cópias/ul)	Cq mean - PVY <sup>N:O/N-Wi</sup>		
618.1/1	Y <sup>O/N-Wi</sup>	N:O/N-Wi	0,00	-	Não testado	Não testado	N:O/N-Wi	-
618.1/3	Y <sup>N/NTN</sup> +Y <sup>O/N:Wi</sup>	N:O/N-Wi	1,35x10 <sup>9</sup>	29,70374002	1,94 x10 <sup>5</sup>	32,43447561	N:O/N-Wi	-
618.1/4	Y <sup>N/NTN</sup>	NTN	Não testado	Não testado	0,00	-	NTN	PVY <sup>E</sup>
618.1/11	Y <sup>N/NTN</sup> +Y <sup>O/N:Wi</sup>	N:O/N-Wi	3,70x10 <sup>9</sup>	27,71906299	2,40 x10 <sup>4</sup>	35,20328509	N:O/N-Wi	-
618.1/18	-	NTN	Não testado	Não testado	1,47 x10 <sup>4</sup>	35,86350451	N:O/N-Wi	NTN
618.1/24	Y <sup>N/NTN</sup> +Y <sup>O/N:Wi</sup>	N:O/N-Wi	1,86x10 <sup>9</sup>	29,05072856	6,46 x10 <sup>5</sup>	30,83359217	N:O/N-Wi	-
618.1/25	Y <sup>O/N-Wi</sup>	N:O/N-Wi	0,00	-	Não testado	Não testado	N:O/N-Wi	-
619.1/2	Y <sup>O/N-Wi</sup>	N:O/N-Wi	0,00	-	Não testado	Não testado	N:O/N-Wi	-
619.1/3	Y <sup>N/NTN</sup>	NTN	Não testado	Não testado	9,73 x10 <sup>3</sup>	36,54801904	N:O/N-Wi	NTN
619.1/4	Y <sup>N/NTN</sup>	NTN	Não testado	Não testado	1,46 x10 <sup>4</sup>	35,86763255	N:O/N-Wi	NTN
619.1/5	Y <sup>N/NTN</sup>	NTN	Não testado	Não testado	1,72 x10 <sup>4</sup>	35,64622004	N:O/N-Wi	NTN
619.1/6	Y <sup>N/NTN</sup>	NTN	Não testado	Não testado	2,47x10 <sup>9</sup>	19,87667001	N:O/N-Wi	NTN
619.1/7	Y <sup>N/NTN</sup> +Y <sup>O/N:Wi</sup>	N:O/N-Wi	3,87x10 <sup>9</sup>	27,63747734	1,35 x10 <sup>4</sup>	35,96400833	N:O/N-Wi	-
619.1/9	Y <sup>N/NTN</sup>	NTN	Não testado	Não testado	9,04 x10 <sup>8</sup>	21,22553763	N:O/N-Wi	NTN
619.1/10	Y <sup>O/N-Wi</sup>	N:O/N-Wi	3,63 x10 <sup>7</sup>	37,05797291	Não testado	Não testado	N:O/N-Wi	-
619.1/13	Y <sup>O/N-Wi</sup>	N:O/N-Wi	0,00	-	Não testado	Não testado	N:O/N-Wi	-
619.2/2	Y <sup>N/NTN</sup> +Y <sup>O/N:Wi</sup>	N:O/N-Wi	1,30 x10 <sup>8</sup>	34,26297106	1,39 x10 <sup>4</sup>	36,03833205	N:O/N-Wi	-
619.2/4	Y <sup>N/NTN</sup>	NTN	Não testado	Não testado	4,51x10 <sup>9</sup>	19,07838672	N:O/N-Wi	NTN
619.2/5	Y <sup>N/NTN</sup>	NTN	Não testado	Não testado	6,03 x10 <sup>8</sup>	21,75439179	N:O/N-Wi	NTN
619.2/9	Y <sup>O/N-Wi</sup>	N:O/N-	1,45 x10 <sup>8</sup>	34,01059536	1,11E+06	30,14693679	N:O/N-Wi	-
622.2/6	-	NTN	Não testado	Não testado	1,26 x10 <sup>4</sup>	36,06127571	N:O/N-Wi	PVY <sup>E</sup>

“Tabela 4, continua”

Isolado	Resultados obtidos no TAS-ELISA: Possível (is) Estirpe(s)	Resultados obtidos por RT-PCR Multiplex	Concentração estimada do número de cópias virais de cada estirpe na RT-qPCR				Resultados da RT-PCR em tempo real	Resultados da RT-PCR para PVY <sup>E</sup>
			Quantificação PVY <sup>NTN</sup>		Quantificação PVY <sup>N:O/N-Wi</sup>			
			(cópias/ul)	Cq mean - PVY <sup>NTN</sup>	(cópias/ul)	Cq mean - PVY <sup>N:O/N-Wi</sup>		
622.2/12	-	NTN	Não testado	Não testado	1,58 x10 <sup>4</sup>	35,77274251	N:O/N-Wi	NTN
622.2/13	-	NTN	Não testado	Não testado	1,53 x10 <sup>4</sup>	35,79586705	N:O/N-Wi	NTN
622.2/15	-	NTN	Não testado	Não testado	8,75 x10 <sup>3</sup>	36,55006709	N:O/N-Wi	NTN
622.2/16	Y <sup>N/NTN</sup> +Y <sup>O/N-Wi</sup>	N:O/N-Wi	1,46 x10 <sup>10</sup>	27,87303431	2,49 x10 <sup>5</sup>	32,14077101	N:O/N-Wi	-
622.2/17	Y <sup>N/NTN</sup> +Y <sup>O/N-Wi</sup>	N:O/N-Wi	6,07 x10 <sup>8</sup>	31,2303922	2,82 x10 <sup>4</sup>	35,82000984	N:O/N-Wi	-
623.3/4	Y <sup>O/N-Wi</sup>	N:O/N-Wi	0,00	-	Não testado	Não testado	N:O/N-Wi	-
623.3/12	-	NTN	Não testado	Não testado	1,71 x10 <sup>4</sup>	35,65093539	N:O/N-Wi	NTN
623.3/16	Y <sup>O/N-Wi</sup>	N:O/N-Wi	0,00	-	Não testado	Não testado	N:O/N-Wi	-
624.3/8	Y <sup>O/N-Wi</sup>	N:O/N-Wi	3,05 x10 <sup>7</sup>	37,07665756	Não testado	Não testado	N:O/N-Wi	-
624.3/24	Y <sup>N/NTN</sup> +Y <sup>O/N-Wi</sup>	N:O/N-Wi	3,24 x10 <sup>7</sup>	36,92630176	1,06 x10 <sup>4</sup>	36,28518088	N:O/N-Wi	-
608/57	Y <sup>O/N-Wi</sup>	N:O/N-Wi	0,00	-	Não testado	Não testado	N:O/N-Wi	-
608/63	Y <sup>N/NTN</sup>	NTN	Não testado	Não testado	8,92 x10 <sup>3</sup>	36,51948134	N:O/N-Wi	PVY <sup>E</sup>
608/84	Y <sup>N/NTN</sup>	NTN	Não testado	Não testado	8,64 x10 <sup>3</sup>	36,5605016	N:O/N-Wi	PVY <sup>E</sup>
608/100	Y <sup>N/NTN</sup>	NTN	Não testado	Não testado	0,00	-	NTN	PVY <sup>E</sup>
609/1	Y <sup>N/NTN</sup>	NTN	Não testado	Não testado	8,44 x10 <sup>3</sup>	36,59912594	N:O/N-Wi	PVY <sup>E</sup>
609/2	Y <sup>N/NTN</sup>	NTN	Não testado	Não testado	1,98x10 <sup>9</sup>	20,17632536	N:O/N-Wi	PVY <sup>E</sup>
609/5	Y <sup>O/N-Wi</sup>	N:O/N-Wi	4,24 x10 <sup>7</sup>	36,47170833	Não testado	Não testado	N:O/N-Wi	-
609/8	Y <sup>N/NTN</sup>	NTN	Não testado	Não testado	1,49 x10 <sup>4</sup>	35,83322255	N:O/N-Wi	PVY <sup>E</sup>
609/11	Y <sup>O/N-Wi</sup>	N:O/N-Wi	1,37 x10 <sup>8</sup>	34,31504967	Não testado	Não testado	N:O/N-Wi	-
609/12	Y <sup>O/N-Wi</sup>	N:O/N-Wi	2,45 x10 <sup>7</sup>	37,46692033	Não testado	Não testado	N:O/N-Wi	-
609/32	Y <sup>N/NTN</sup>	NTN	Não testado	Não testado	3,44 x10 <sup>8</sup>	22,49951924	N:O/N-Wi	PVY <sup>E</sup>
609/41	Y <sup>N/NTN</sup>	NTN	Não testado	Não testado	8,30 x10 <sup>8</sup>	21,3231306	N:O/N-Wi	PVY <sup>E</sup>
609/49	Y <sup>N/NTN</sup>	NTN	Não testado	Não testado	8,12 x10 <sup>8</sup>	21,35228952	N:O/N-Wi	PVY <sup>E</sup>

“Tabela 4, continua”

Isolado	Resultados obtidos no TAS-ELISA: Possível (is) Estirpe(s)	Resultados obtidos por RT-PCR Multiplex	Concentração estimada do número de cópias virais de cada estirpe na RT-qPCR				Resultados da RT-PCR em tempo real	Resultados da RT-PCR para PVY <sup>E</sup>
			Quantificação PVY <sup>NTN</sup>		Quantificação PVY <sup>N:O/N-Wi</sup>			
			(cópias/ul)	Cq mean - PVY <sup>NTN</sup>	(cópias/ul)	Cq mean - PVY <sup>N:O/N-Wi</sup>		
609/61	Y <sup>O/N-Wi</sup>	N:O/N-Wi	2,90 x10 <sup>7</sup>	37,14625373	Não testado	Não testado	N:O/N-Wi	-
609/65	Y <sup>N/NTN</sup>	NTN	Não testado	Não testado	6,67 x10 <sup>12</sup>	9,400928136	N:O/N-Wi	PVY <sup>E</sup>
609/68	Y <sup>O/N-Wi</sup>	N:O/N-Wi	4,06 x10 <sup>7</sup>	36,51426818	Não testado	Não testado	N:O/N-Wi	-
609/77	Y <sup>N/NTN</sup>	NTN	Não testado	Não testado	1,87 x10 <sup>8</sup>	23,31606989	N:O/N-Wi	PVY <sup>E</sup>
609/93	Y <sup>O/N-Wi</sup>	N:O/N-Wi	5,40 x10 <sup>7</sup>	35,98751816	Não testado	Não testado	N:O/N-Wi	-
610/1	Y <sup>N/NTN</sup>	NTN	Não testado	Não testado	1,84 x10 <sup>4</sup>	35,55412362	N:O/N-Wi	NTN
610/5	Y <sup>N/NTN</sup>	NTN	Não testado	Não testado	2,00 x10 <sup>4</sup>	35,45216269	N:O/N-Wi	PVY <sup>E</sup>
610/14	Y <sup>N/NTN</sup>	NTN	Não testado	Não testado	3,58 x10 <sup>8</sup>	22,45342285	N:O/N-Wi	PVY <sup>E</sup>
610/22	Y <sup>O/N-Wi</sup>	N:O/N-Wi	0,00	-	Não testado	Não testado	N:O/N-Wi	-
610/27	Y <sup>N/NTN</sup>	NTN	Não testado	Não testado	2,77 x10 <sup>5</sup>	32,00341781	N:O/N-Wi	PVY <sup>E</sup>
610/33	Y <sup>N/NTN</sup>	NTN	Não testado	Não testado	2,97 x10 <sup>2</sup>	22,31860649	N:O/N-Wi	PVY <sup>E</sup>
610/35	Y <sup>N/NTN</sup>	NTN	Não testado	Não testado	3,59 x10 <sup>8</sup>	22,4463702	N:O/N-Wi	PVY <sup>E</sup>
610/41	Y <sup>N/NTN</sup>	NTN	Não testado	Não testado	2,19 x10 <sup>5</sup>	32,69367569	N:O/N-Wi	NTN
610/42	Y <sup>N/NTN</sup>	NTN	Não testado	Não testado	3,80 x10 <sup>6</sup>	29,61133997	N:O/N-Wi	PVY <sup>E</sup>
610/44	Y <sup>N/NTN</sup>	NTN	Não testado	Não testado	1,93 x10 <sup>7</sup>	26,32725208	N:O/N-Wi	PVY <sup>E</sup>
610/51	Y <sup>N/NTN</sup>	NTN	Não testado	Não testado	0,00	-	NTN	PVY <sup>E</sup>
610/56	Y <sup>N/NTN</sup>	NTN	Não testado	Não testado	1,91 x10 <sup>8</sup>	23,31562814	N:O/N-Wi	PVY <sup>E</sup>
610/57	Y <sup>N/NTN</sup>	NTN	Não testado	Não testado	0,00	-	NTN	NTN
610/69	Y <sup>N/NTN</sup> +Y <sup>O/N-Wi</sup>	N:O/N-Wi	4,46 x10 <sup>7</sup>	36,35943206	2,06 x10 <sup>4</sup>	35,42200619	N:O/N-Wi	-
610/77	Y <sup>N/NTN</sup>	NTN	Não testado	Não testado	0,00	-	NTN	PVY <sup>E</sup>
610/82	Y <sup>O/N-Wi</sup>	N:O/N-Wi	2,79 x10 <sup>7</sup>	37,22729336	3,21 x10 <sup>4</sup>	34,81928357	N:O/N-Wi	-
610/93	Y <sup>O/N-Wi</sup>	N:O/N-Wi	0,00	-	Não testado	Não testado	N:O/N-Wi	-
610/94	Y <sup>N/NTN</sup> +Y <sup>O/N-Wi</sup>	N:O/N-Wi	3,87x10 <sup>9</sup>	27,66220338	2,24 x10 <sup>6</sup>	29,18211226	N:O/N-Wi	-

“Tabela 4, continua”

Isolado	Resultados obtidos no TAS-ELISA: Possível (is) Estirpe(s)	Resultados obtidos por RT-PCR Multiplex	Concentração estimada do número de cópias virais de cada estirpe na RT-qPCR				Resultados da RT-PCR em tempo real	Resultados da RT-PCR para PVY <sup>E</sup>
			Quantificação PVY <sup>NTN</sup>		Quantificação PVY <sup>N:O/N-Wi</sup>			
			(cópias/ul)	Cq mean - PVY <sup>NTN</sup>	(cópias/ul)	Cq mean - PVY <sup>N:O/N-Wi</sup>		
610/95	Y <sup>N/NTN</sup>	NTN	Não testado	Não testado	1,53 x10 <sup>7</sup>	26,63769392	N:O/N-Wi	NTN
610/100	Y <sup>O/N-Wi</sup>	N:O/N-Wi	0,00	-	Não testado	Não testado	N:O/N-Wi	-
611/33	Y <sup>N/NTN</sup> +Y <sup>O/N-Wi</sup>	N:O/N-Wi	3,70 x10 <sup>10</sup>	23,29430614	7,99 x10 <sup>5</sup>	30,6067401	N:O/N-Wi	-
612/4	Y <sup>O/N-Wi</sup>	N:O/N-Wi	5,50 x10 <sup>7</sup>	35,91750303	Não testado	Não testado	N:O/N-Wi	-
612/27	Y <sup>N/NTN</sup>	NTN	Não testado	Não testado	1,11 x10 <sup>4</sup>	36,23167288	N:O/N-Wi	PVY <sup>E</sup>
612/34	Y <sup>N/NTN</sup>	NTN	Não testado	Não testado	2,15 x10 <sup>9</sup>	20,06055606	N:O/N-Wi	PVY <sup>E</sup>
612/46	Y <sup>O/N-Wi</sup>	N:O/N-Wi	2,41 x10 <sup>7</sup>	37,50534109	Não testado	Não testado	N:O/N-Wi	-
612/56	Y <sup>N/NTN</sup>	NTN	Não testado	Não testado	9,88 x10 <sup>7</sup>	24,17179004	N:O/N-Wi	PVY <sup>E</sup>
612/57	Y <sup>O/N-Wi</sup>	N:O/N-Wi	5,85 x10 <sup>7</sup>	35,78217015	Não testado	Não testado	N:O/N-Wi	-
612/59	Y <sup>N/NTN</sup>	NTN	Não testado	Não testado	9,71 x10 <sup>7</sup>	24,20286247	N:O/N-Wi	PVY <sup>E</sup>
612/73	-	N:O/N-Wi	4,09 x10 <sup>7</sup>	36,50356751	2,48 x10 <sup>4</sup>	35,16534415	N:O/N-Wi	-
612/76	Y <sup>N/NTN</sup>	NTN	Não testado	Não testado	1,70 x10 <sup>8</sup>	23,48101011	N:O/N-Wi	NTN
612/86	Y <sup>N/NTN</sup>	NTN	Não testado	Não testado	1,04 x10 <sup>8</sup>	24,10525276	N:O/N-Wi	PVY <sup>E</sup>
CMF1	Y <sup>N/NTN</sup> +Y <sup>O/N-Wi</sup>	N:O/N-Wi	2,79 x10 <sup>10</sup>	23,79259596	1,30 x10 <sup>7</sup>	26,85369	N:O/N-Wi	-
CMF2	Y <sup>O/N-Wi</sup>	N:O/N-Wi	6,56 x10 <sup>7</sup>	35,56887921	Não testado	Não testado	N:O/N-Wi	-
CMF9	Y <sup>O/N-Wi</sup>	N:O/N-Wi	0,00	-	Não testado	Não testado	N:O/N-Wi	-
CMF10	Y <sup>O/N-Wi</sup>	N:O/N-Wi	0,00	-	Não testado	Não testado	N:O/N-Wi	-
CMF18	Y <sup>O/N-Wi</sup>	N:O/N-Wi	3,20 x10 <sup>7</sup>	36,95029825	Não testado	Não testado	N:O/N-Wi	-
CMF19	Y <sup>O/N-Wi</sup>	N:O/N-Wi	0,00	-	Não testado	Não testado	N:O/N-Wi	-
CMF20	Y <sup>O/N-Wi</sup>	N:O/N-Wi	0,00	-	Não testado	Não testado	N:O/N-Wi	-
CMF21	Y <sup>O/N-Wi</sup>	N:O/N-Wi	0,00	-	Não testado	Não testado	N:O/N-Wi	-
CMF22	Y <sup>O/N-Wi</sup>	N:O/N-Wi	0,00	-	Não testado	Não testado	N:O/N-Wi	-
CMF24	Y <sup>O/N-Wi</sup>	N:O/N-Wi	0,00	-	Não testado	Não testado	N:O/N-Wi	-



“Tabela 4, continua”

Isolado	Resultados obtidos no TAS-ELISA: Possível (is) Estirpe(s)	Resultados obtidos por RT-PCR Multiplex	Concentração estimada do número de cópias virais de cada estirpe na RT-qPCR				Resultados da RT-PCR em tempo real	Resultados da RT-PCR para PVY <sup>E</sup>
			Quantificação PVY <sup>NTN</sup>		Quantificação PVY <sup>N:O/N-Wi</sup>			
			(cópias/ul)	Cq mean - PVY <sup>NTN</sup>	(cópias/ul)	Cq mean - PVY <sup>N:O/N-Wi</sup>		
CMF33	Y <sup>O/N-Wi</sup>	N:O/N-Wi	0,00	-	Não testado	Não testado	N:O/N-Wi	-
CMF45	Y <sup>N/NTN</sup>	NTN	Não testado	Não testado	0,00	-	NTN	PVY <sup>E</sup>
CMF46	Y <sup>N/NTN</sup>	NTN	Não testado	Não testado	0,00	-	NTN	PVY <sup>E</sup>
CMF47	Y <sup>O/N-Wi</sup>	N:O/N-Wi	0,00	-	Não testado	Não testado	N:O/N-Wi	-
CMF48	Y <sup>O/N-Wi</sup>	N:O/N-Wi	0,00	-	Não testado	Não testado	N:O/N-Wi	-
CMF49	Y <sup>O/N-Wi</sup>	N:O/N-Wi	6,46 x10 <sup>7</sup>	35,59546173	Não testado	Não testado	N:O/N-Wi	-
CMF50	Y <sup>N/NTN</sup>	NTN	Não testado	Não testado	1,31 x10 <sup>4</sup>	36,01686349	N:O/N-Wi	PVY <sup>E</sup>
CMF51	Y <sup>O/N-Wi</sup>	N:O/N-Wi	3,25 x10 <sup>7</sup>	36,93863643	Não testado	Não testado	N:O/N-Wi	-
CMF52	Y <sup>O/N-Wi</sup>	N:O/N-Wi	3,06 x10 <sup>7</sup>	37,12386113	Não testado	Não testado	N:O/N-Wi	-
CMF53	Y <sup>O/N-Wi</sup>	N:O/N-Wi	2,46 x10 <sup>7</sup>	37,45816764	Não testado	Não testado	N:O/N-Wi	-
CMF54	Y <sup>N/NTN</sup>	NTN	Não testado	Não testado	7,21 x10 <sup>8</sup>	21,51982125	N:O/N-Wi	PVY <sup>E</sup>
CMF55	Y <sup>O/N-Wi</sup>	N:O/N-Wi	0,00	-	Não testado	Não testado	N:O/N-Wi	-
CMF56	Y <sup>O/N-Wi</sup>	N:O/N-Wi	0,00	-	Não testado	Não testado	N:O/N-Wi	-
CMF57	Y <sup>O/N-Wi</sup>	N:O/N-Wi	3,95 x10 <sup>7</sup>	36,54699917	Não testado	Não testado	N:O/N-Wi	-
CMF59	Y <sup>O/N-Wi</sup>	N:O/N-Wi	3,63 x10 <sup>7</sup>	36,94857672	Não testado	Não testado	N:O/N-Wi	-
CMF60	Y <sup>O/N-Wi</sup>	N:O/N-Wi	0,00	-	Não testado	Não testado	N:O/N-Wi	-
CMF61	Y <sup>O/N-Wi</sup>	N:O/N-Wi	2,38 x10 <sup>7</sup>	37,69638978	Não testado	Não testado	N:O/N-Wi	-
CMF62	Y <sup>O/N-Wi</sup>	N:O/N-Wi	0,00	-	Não testado	Não testado	N:O/N-Wi	-
CMF63	Y <sup>N/NTN</sup> +Y <sup>O/N-Wi</sup>	N:O/N-Wi	1,00x10 <sup>9</sup>	30,2752862	1,49 x10 <sup>6</sup>	29,72464175	N:O/N-Wi	-
CMF64	Y <sup>O/N-Wi</sup>	N:O/N-Wi	4,95 x10 <sup>7</sup>	36,10063786	Não testado	Não testado	N:O/N-Wi	-
CMF65	Y <sup>O/N-Wi</sup>	N:O/N-Wi	0,00	-	Não testado	Não testado	N:O/N-Wi	-
CMF66	Y <sup>N/NTN</sup>	NTN	Não testado	Não testado	2,23 x10 <sup>12</sup>	10,84354953	N:O/N-Wi	PVY <sup>E</sup>
CMF67	Y <sup>O/N-Wi</sup>	N:O/N-Wi	4,47 x10 <sup>7</sup>	36,30531371	Não testado	Não testado	N:O/N-Wi	-

“Tabela 4, continua”

Isolado	Resultados obtidos no TAS-ELISA: Possível (is) Estirpe(s)	Resultados obtidos por RT-PCR Multiplex	Concentração estimada do número de cópias virais de cada estirpe na RT-qPCR				Resultados da RT-PCR em tempo real	Resultados da RT-PCR para PVY <sup>E</sup>
			Quantificação PVY <sup>NTN</sup>		Quantificação PVY <sup>N:O/N-Wi</sup>			
			(cópias/ul)	Cq mean - PVY <sup>NTN</sup>	(cópias/ul)	Cq mean - PVY <sup>N:O/N-Wi</sup>		
CMF68	Y <sup>O/N-Wi</sup>	N:O/N-Wi	1,13 x10 <sup>8</sup>	34,50226521	Não testado	Não testado	N:O/N-Wi	-
CMF69	Y <sup>O/N-Wi</sup>	N:O/N-Wi	0,00	-	Não testado	Não testado	N:O/N-Wi	-
CMF70	Y <sup>N/NTN</sup>	NTN	Não testado	Não testado	0,00	-	NTN	PVY <sup>E</sup>
CMF71	Y <sup>O/N-Wi</sup>	N:O/N-Wi	2,68 x10 <sup>7</sup>	37,35829061	Não testado	Não testado	N:O/N-Wi	-
CMF72	Y <sup>N/NTN</sup>	NTN	Não testado	Não testado	2,66 x10 <sup>8</sup>	22,8391645	N:O/N-Wi	PVY <sup>E</sup>
CMF73	Y <sup>O/N-Wi</sup>	N:O/N-Wi	0,00	-	Não testado	Não testado	N:O/N-Wi	-
CMF74	Y <sup>O/N-Wi</sup>	N:O/N-Wi	0,00	-	Não testado	Não testado	N:O/N-Wi	-
CMF75	Y <sup>O/N-Wi</sup>	N:O/N-Wi	1,99 x10 <sup>9</sup>	29,45833281	Não testado	Não testado	N:O/N-Wi	-
CMF76	Y <sup>O/N-Wi</sup>	N:O/N-Wi	2,84 x10 <sup>7</sup>	37,1815407	Não testado	Não testado	N:O/N-Wi	-
CMF77	Y <sup>N/NTN</sup> +Y <sup>O/N-Wi</sup>	N:O/N-Wi	4,11x10 <sup>9</sup>	27,53881993	4,13 x10 <sup>6</sup>	28,36681148	N:O/N-Wi	-
CMF78	Y <sup>O/N-Wi</sup>	N:O/N-Wi	0,00	-	Não testado	Não testado	N:O/N-Wi	-
CMF79	Y <sup>O/N-Wi</sup>	N:O/N-Wi	0,00	-	Não testado	Não testado	N:O/N-Wi	-
CMF80	Y <sup>O/N-Wi</sup>	N:O/N-Wi	0,00	-	Não testado	Não testado	N:O/N-Wi	-
CMF81	Y <sup>O/N-Wi</sup>	N:O/N-Wi	0,00	-	Não testado	Não testado	N:O/N-Wi	-
CMF82	Y <sup>O/N-Wi</sup>	N:O/N-Wi	4,45 x10 <sup>7</sup>	36,34161246	Não testado	Não testado	N:O/N-Wi	-
CMF83	Y <sup>O/N-Wi</sup>	N:O/N-Wi	0,00	-	Não testado	Não testado	N:O/N-Wi	-
CMF84	Y <sup>O/N-Wi</sup>	N:O/N-Wi	0,00	-	Não testado	Não testado	N:O/N-Wi	-
CMF87	Y <sup>O/N-Wi</sup>	N:O/N-Wi	0,00	-	Não testado	Não testado	N:O/N-Wi	-
CMF99	Y <sup>O/N-Wi</sup>	N:O/N-Wi	0,00	-	Não testado	Não testado	N:O/N-Wi	-
CMF36	Y <sup>O/N-Wi</sup>	N:O/N-Wi	0,00	-	Não testado	Não testado	N:O/N-Wi	-
CMF39	Y <sup>O/N-Wi</sup>	N:O/N-Wi	0,00	-	Não testado	Não testado	N:O/N-Wi	-
CMF41	Y <sup>O/N-Wi</sup>	N:O/N-Wi	0,00	-	Não testado	Não testado	N:O/N-Wi	-
CMF42	Y <sup>O/N-Wi</sup>	N:O/N-Wi	0,00	-	Não testado	Não testado	N:O/N-Wi	-

“Tabela 4, conclusão”

Isolado	Resultados obtidos no TAS-ELISA: Possível (is) Estirpe(s)	Resultados obtidos por RT-PCR Multiplex	Concentração estimada do número de cópias virais de cada estirpe na RT-qPCR				Resultados da RT-PCR em tempo real	Resultados da RT-PCR para PVY <sup>E</sup>
			Quantificação PVY <sup>NTN</sup>		Quantificação PVY <sup>N:O/N-Wi</sup>			
			(cópias/ul)	Cq mean - PVY <sup>NTN</sup>	(cópias/ul)	Cq mean - PVY <sup>N:O/N-Wi</sup>		
CMF44	Y <sup>O/N-Wi</sup>	N:O/N-Wi	2,47 x10 <sup>7</sup>	37,47468622	Não testado	Não testado	N:O/N-Wi	-
CMF89	Y <sup>N/NTN</sup>	NTN	Não testado	Não testado	3,28 x10 <sup>8</sup>	22,69861167	N:O/N-Wi	PVY <sup>E</sup>
CMF91	Y <sup>O/N-Wi</sup>	N:O/N-Wi	4,711x10 <sup>7</sup>	36,19691904	Não testado	Não testado	N:O/N-Wi	-
CMF92	Y <sup>O/N-Wi</sup>	N:O/N-Wi	2,62 x10 <sup>7</sup>	37,38360012	Não testado	Não testado	N:O/N-Wi	-
CMF94	Y <sup>N/NTN</sup>	NTN	Não testado	Não testado	1,07 x10 <sup>8</sup>	24,04227766	N:O/N-Wi	PVY <sup>E</sup>
CMF98	Y <sup>O/N-Wi</sup>	N:O/N-Wi	1,38 x10 <sup>10</sup>	25,16378439	Não testado	Não testado	N:O/N-Wi	-
S1	-	NTN	Não testado	Não testado	0,00	-	NTN	PVY <sup>E</sup>
S3	-	NTN	Não testado	Não testado	0,00	-	NTN	PVY <sup>E</sup>
S4	Y <sup>N/NTN</sup>	NTN	Não testado	Não testado	0,00	-	NTN	PVY <sup>E</sup>
S5	Y <sup>N/NTN</sup>	NTN	Não testado	Não testado	1,17 x10 <sup>4</sup>	36,20015247	N:O/N-Wi	PVY <sup>E</sup>
S6	-	NTN	Não testado	Não testado	1,47 x10 <sup>4</sup>	35,87514649	N:O/N-Wi	PVY <sup>E</sup>
S7	Y <sup>N/NTN</sup>	NTN	Não testado	Não testado	2,18 x10 <sup>8</sup>	23,10690016	N:O/N-Wi	PVY <sup>E</sup>
S8	Y <sup>N/NTN</sup>	NTN	Não testado	Não testado	1,37 x10 <sup>7</sup>	28,44642881	N:O/N-Wi	NTN
S11	Y <sup>O/N-Wi</sup>	N:O/N-Wi	3,64 x10 <sup>7</sup>	36,84576582	Não testado	Não testado	N:O/N-Wi	-
S16	Y <sup>O/N-Wi</sup>	N:O/N-Wi	0,00	-	3,13 x10 <sup>6</sup>	28,73365302	N:O/N-Wi	-

## 5 CONCLUSÕES

1. Padrões sorológicos e moleculares atípicos foram observados em amostras de Ouro fino, São Gotardo, Maria da Fé e Cristina.
2. As estirpes de PVY prevalentes no campo foram a Wilga e a NTN, presentes em infecções simples ou mistas.
3. A incidência de cada estirpe mudou em diferentes campos amostrados: o índice de infecções simples pela estirpe Wilga foi maior nas amostras do campo de Maria da Fé, porém as infecções mistas foram mais expressivas, com destaque para as amostras do campo de Ouro Fino.
4. O teste de RT-qPCR identificou quatro vezes mais infecções mistas nas amostras analisadas quando comparado ao teste sorológico TAS-ELISA e três vezes mais que no RT-PCR convencional.
5. Os dados finais de RT-qPCR evidenciaram que esse teste é o mais confiável para detecção de amostras com coinfeção devido a possíveis baixas concentrações de uma das estirpes, concentrações essas não detectáveis pelos limiares de detecção dos testes sorológicos e de RT-PCR.
6. Diversas amostras inicialmente detectadas como pertencentes à estirpe PVY<sup>NTN</sup>, foram classificadas como pertencentes à estirpe recombinante PVY<sup>E</sup>, após serem submetidos a um RT-PCR adicional.

## REFERÊNCIAS

- ADAMS, M. J.; ANTONIW, J. F.; FAUQUET, M. C. Molecular criteria for genus and species discrimination within the family *Potyviridae*. **Archives of Virology**, New York, v. 150, p. 459–479, 2005.
- AFGC PROTOCOLS. Disponível em:  
<<http://www.arabdopsis.org/portals/masc/AFGC/RevisedAFGC/site2RnaL.htm#isolation>>. Acesso em: 20 dez. 2014.
- AGINDOTAN, B. O.; SHIEL, P. J.; BERGER, P. H. Simultaneous detection of potato viruses, PLRV, PVA, PVX and PVY from dormant potato tubers by TaqMan real-time RT-PCR. **J. Journal of Virological Methods**, Amsterdam, v. 142, n. 1/2, p. 1-9, 2007.
- AGRIANUAL: anuário da agricultura brasileira. 17. ed. São Paulo: FNP, **Consultoria e Comércio**, 2012.
- AMARAL, A. O. et al. A viabilidade econômica da cultura da batata. **Custos e @gronegocio on line**, Recife, v. 8, n. 2, abr./jun. 2012.
- AMMAR, E. D.; JARLFORS, U.; PIRONE, T. P. Association of potyvirus helper component protein with virions and the cuticle lining the maxillar food canal and foregut of na aphid vector. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 84, p. 1054-1060, 1994.
- AVILA, A. C.; MELO, P. C.; LEITE, L. R. O virus Y da batata (*Potato virus Y*) e a batata-semente nacional: Quem vencerá? **Batata Show**, Itapetininga, v. 7, n. 17, p. 14-17, abr. 2007.
- BALDAUF, P. M.; GRAY, S. M.; PERRY, K. L. Biological and serological properties of *Potato virus Y* isolates in northeastern United States potato. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 90, p. 559-566, 2006.
- BALME-SINIBALDI, V. et al. Improvement of *Potato virus Y* (PVY) detection and quantitation using PVYN- and PVYO-specific real-time RT-PCR assays. **Journal of Virological Methods**, Amsterdam, v. 134, p. 261–266, 2006.

- BECZNER, L. et al. Studies on the etiology of tuber necrotic ringspot disease in potato. **Potato Research**, Wageningen, v. 27, n. 3, p. 339-352, 1984.
- BERGER, P. H. et al. Potyviridae. In: FAUQUET, C. M. et al. **Virus taxonomy: Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses**. San Diego: Academic, 2005. p. 819-842.
- BERGERVOET, J. H. W. et al. Multiplex microsphere immuno-detection of potato virus Y, X and PLRV. **Journal of Virological Methods**, Amsterdam, v. 149, p. 63–68, 2008.
- BIRCH, P. R. J. et al. Crops that feed the world 8: Potato: are the trends of increased global production sustainable? **Food Security**, Cham, v. 4, p. 477–508, 2012.
- BLANCO-URGOITI, B. et al. Characterization of potato virus Y (PVY) isolates from seed potato batches: situation of the NTN, Wilga and Z isolates. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 104, n. 8, p. 811-819, Nov. 1998.
- BLANC, S. et al. A specific interaction between Coat Protein and Helper Component Correlates with Aphid Transmission of a Potyvirus. **Virology**, New York, v. 231, p. 141–147, 1997.
- BLANC, S. et al. Mutations in the potyvirus helper component protein: effects on interactions with virions and aphid stylets. **Journal of General Virology**, London, v. 79, p. 3119-3122, 1998.
- BOONHAM, N. et al. The detection of tuber necrotic isolates of *Potato virus Y*, and the accurate discrimination of PVYO, PVYN and PVYC strains using RT-PCR. **Journal of Virological Methods**, Amsterdam, v. 102, p. 103–112, 2002.
- BRAULT, V. et al. Aphids as transport devices for plant viruses. **Comptes Rendus Biologies**, Paris, v. 333, p. 524-538, 2010.
- BRAVO-ALMONACID, F. et al. Field testing, gene flow assessment and pre-commercial studies on transgenic *Solanum tuberosum* spp. *tuberosum*

(cv. Spunta) selected for PVY resistance in Argentina. **Transgenic Research**, London, v. 21, p. 967–982, 2012.

BUSTIN, S. A. et al. The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. **Clinical Chemistry**, New York, v. 55, n. 4, p. 1-12, 2009.

CAMARGO FILHO, W. P.; ALVES, H. S. Mercado de batata no Brasil: análise de produção, importação e preços. **Informações Econômicas**, São Paulo, v. 35, n. 5, maio 2005.

CARRINGTON, J. C.; JENSEN, P. E.; SCHAAD, M. C. Genetic evidence for an essential role for potyvirus CI protein in cell-to-cell movement. **The Plant Journal**, Oxford, v.14, n. 4, p. 393-400, 1998.

CHIKH-ALI, M. et al. The simultaneous differentiation of Potato virus Y strains including the newly described strain PVYNTN-NW by multiplex PCR assay. **Journal of Virological Methods**, Amsterdam, v. 165, p. 15–20, 2010.

CHUNG, B. Y. W. et al. An overlapping essential gene in the Potyviridae. **Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America**, Washington, v. 105, n. 15, p. 5897-5902, 2008.

COSTA, R. R. et al. Controle da disseminação de vírus por meio de vetores na cultura da batata. **Acta Scientiarum. Agronomy**, Maringá, v. 32, n. 4, p. 591-596, 2010.

CUEVAS, J. M. et al. Phylogeography and molecular evolution of *Potato virus Y*. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 7, n. 5, maio 2012. Disponível em: <<http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0037853>>. Acesso em: 22 jun. 2015.

DAI, J. et al. Development of multiplex real-time PCR for simultaneous detection of three Potyviruses in tobacco plants. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 114, n. 2, p. 502-508, 2013.

DE BOKX, J. A.; HUTTINGA, H. Potato virus Y: descriptions of plants viruses, AAB. 1981. Disponível em:

<<http://www.dpvweb.net/dpv/showdpv.php?dpvno=242>>. Acesso em: 15 jan. 2015.

DELGADO-SANCHEZ, S.; GROGAN, R. G. Potato virus Y: descriptions of plants viruses, AAB. 1970. Disponível em: <<http://www.dpvweb.net/dpv/showdpv.php?dpvno=37>>. Acesso em: 15 jan. 2015.

DJILANI-KHOUDJA, F. et al. Incidence of potato viruses and characterisation of *Potato virus Y* variability in late season planted potato crops in Northern Tunisia. **European Journal of Plant Pathology**, London, v. 126, p. 479–488, 2010.

DUBIELA, C. R. et al. Simultaneous detection of Brazilian isolates of grapevine viruses by TaqMan real-time RT-PCR. **Tropical Plant Pathology**, Lavras, v. 38, n. 2, p. 158-165, 2013.

DU, Z.; CHEN, J.; HIRUKI, C. Optimization and application of a multiplex RT-PCR system for simultaneous detection of five potato viruses using 18S rRNA as an internal control. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 90, p. 185-189, 2006.

ELENA, S. F.; BERNET, G. P.; CARRASCO, J. L. The game plant viruses play. **Current Opinion in Virology**, Oxford, v. 8, p. 62-67, 2014.

ELLIS, P.; STACE-SMITH, R.; VILLIERS, G. Production of monoclonal antibodies for detection and identification of strains of potato virus Y. **Canadian Journal of Plant Pathology**, Ottawa, v. 18, n. 1, p. 64-70, 1996.

FAGERIA, M. S. et al. Monitoring current-season spread of *Potato virus Y* in potato fields using ELISA and real-time RT-PCR. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 97, p. 641-644, 2013.

FIGUEIRA, A. R. Viroses da batata: situação atual e perspectivas futuras. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 20, n. 197, p. 86-96, mar./abr. 1999.

FIGUEIRA, A. R. Vírus S (*Potato virus S*-PVS), vírus X (*Potato virus X*-PVX): Qual seria a sua importância para a bataticultura brasileira. **Batata Show**, Itapetininga, v. 2, n. 4, p. 8-11, 2002.



FIGUEIREDO, P. G. et al. Cultivares, qualidade de tubérculos e comercialização da batata no Brasil. **Revista Raízes e Amidos Tropicais**, Botucatu, v. 7, p. 42-52, 2011.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. Database collection: agricultural data. 2013. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/>>. Acesso em: 18 dez. 2014.

GALVINO-COSTA, S. B. F. et al. A novel type of Potato virus Y recombinant genome, determined for the genetic strain PVY<sup>E</sup>. **Plant Pathology**, Oxford, v. 61, p. 388-398, 2012b.

GALVINO-COSTA, S. B. F. et al. Molecular and serological typing of *Potato virus Y* isolates from Brazil reveals a diverse set of recombinant strain. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 96, p. 1451-1458, 2012a.

GAO, F. L. et al. Sequence variation and protein structure of *pipo* gene in *Potato virus Y*. **Hereditas**, Landskrona, v. 35, n.9, p. 1125-1134, 2013.

GLAIS, L.; TRIBODET, M.; KERLAN, C. Genomic variability in *Potato virus Y* (PVY): evidence that PVYN-W and PVYNTN variants are single to multiple recombinants between PVYO and PVYN isolates. **Archives of Virology**, New York, v. 147, n. 2, p. 363-378, 2002.

GRAY, S. et al. Potato virus Y: an evolving concern for potato crops in the United States and Canada. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 94, n. 12, p. 1384-1397, 2010.

GURGELI, P.; FRIES, P. Characterization of monoclonal antibodies to *potato virus Y* and their use for virus detection. **Journal of General Virology**, London, v. 64, p. 2471-2477, 1983.

HALTERMAN, D.; CHARKOWSKI, A.; VERCHOT, J. Potato, viruses, and seed certification in the USA to provide healthy propagated tubers. **Pest Technology**, Chott-Mariem, v. 6, n. 1, p. 1-14, 2012.

HANE, D. C.; HAMM, P. B. Effects of seedborne potato virus Y infection in two potato cultivars expressing mild disease symptoms. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 83, p. 43-45, 1999.

HARRINGTON, R.; KATIS, N.; GIBSON, R. W. Field assessment of the relative importance of different aphid species in the transmission of *potato virus Y*. **Potato Research**, Wageningen, v. 29, p. 67-76, 1986.

HARRISON, B. D. et al. Sixteen groups of plant viruses. **Virology**, New York, v. 45, p. 356-363, 1971.

HEID, C. A. et al. Real time quantitative PCR. **Genome Research**, Cold Spring Harbor, v. 6, n. 10, p. 986-94, 1996.

**HOLLAND, P. M. et al.** Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'----3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 15, n. 88, p. 7276-7280, 1991.

HU, X. et al. Sequence characteristics of potato virus Y recombinants. **Journal of General Virology**, London, v. 90, p. 3033–3041, 2009.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Pesquisa mensal de previsão e acompanhamento das safras agrícolas no ano civil. **Levantamento Sistemático da Produção Agrícola**, Rio de Janeiro, v. 26, n.1, p. 1-83, jan. 2013.

INTERNACIONAL POTATO CENTER. Agricultural Research for Development. 2013. Disponível em: <<http://cipotato.org/potato-2/>>. Acesso em: 5 fev. 2015.

JONES, R. A. C. Strain group specific and virus specific hypersensitive reactions to infection with potyviruses in potatocultivars. **Annals of Applied Biology**, Warwick, v. 117, n. 1, p. 93-105, 1990.

KARASEV, A. V. et al. Serological properties of ordinary and necrotic isolates of *Potato virus Y*: a case study of PVYN misidentification. **American Journal of Potato Research**, Orono, v. 87, n. 1, p. 1-9, 2010.

KARASEV, A. V.; GRAY, S. M. Continuous and emerging Challenges of *Potato virus Y* in Potato. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 51, p. 575-586, 2013.

KERLAN, C. et al. Identification of the molecular make-up of the *Potato virus Y* strain PVYZ: genetic typing of PVYZ-NTN. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 101, n. 9, p. 1052-1060, 2011.

KERLAN, C. Evolution in *POTATO VIRUS Y*: from recombination in the genome to emergence and spreading of variants. **Potato Research**, Rennes, v. 46, n. 3/4, p. 184, Jun. 2004.

KERLAN, C.; LE ROMANCER, M. Potato tuber necrotic ringspot disease. In: EAPR MEETING VIROLOGY SECTION, 1., 1999, Vitoria-Gasteiz. **Proceedings...** Vitoria-Gasteiz: The European Association for Potato Research, 1999. p. 77-79.

KERLAN, C.; MOURY, B. *Potato virus Y*. In: ENCYCLOPEDIA OF VIROLOGY. 3<sup>rd</sup> ed. Oxford: Elsevier, 2008. v. 4, p. 287-296.

KERLAN, C. **Potato virus Y**: descriptions of plant viruses. Warwick: AAB, 2006. (Association of Applied Biologists, 414). Disponível em: <<http://www.dpvweb.net/dpv/showdpv.php?dpvno=414>>. Acesso em: 15 dez. 2014.

LARBI, I. et al. Potato virus surveys and wide spread of recombinant PVYNTN variant in Central Tunisia. **African Journal of Microbiology Research**, Lagos, v. 6, n. 9, p. 2109-2115, 2012.

LE ROMANCER, M.; NEDELLEC, M. Effect of plant genotype, virus isolate and temperature on the expression of the potato tuber necrotic ringspot disease (PTNRD). **Plant Pathology**, Oxford, v. 46, p. 104-111, 1997.

LOPES, C. A. et al. **Doenças da batata (*Solanum tuberosum* L.)**. Brasília: Embrapa Hortaliças, 2014. Disponível em: <<http://www.sbfito.com.br/divulgacao/DoencasdaBatata.pdf>>. Acesso em: 5 jan. 2015.

LORENZEN, J. H. et al. A multiplex PCR assay to characterize *Potato virus Y* isolates and identify strain mixtures. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 90, n. 7, p. 935-940, 2006a.

LORENZEN, J. H. et al. NE-11 represents a new strain variant class of *Potato virus Y*. **Archives of virology**, New York, v. 153, n. 3, p. 517-725, 2008.

LORENZEN, J. H. et al. Whole genome characterization of *Potato virus Y* isolates collected in the western USA and their comparison to isolates from Europe and Canada. **Archives of Virology**, Wien, v. 151, p 1055-1074, 2006b.

LUIGI, M.; FAGGIOLI, F. Development of quantitative real-time RT-PCR for the detection and quantification of Peach latent mosaic virus. **European Journal of Plant Pathology**, London, v. 130, p. 109–116, 2011.

MAAT, D. Z.; DE BOKX, J. A. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of potato viroses A and Y in potato leaves and sprouts. **Netherlands Journal of Plant Pathology**, Berlin, v. 84, p. 167-173, 1978.

MCDONALD, J. G.; KRISTJANSSON, G. T. Properties of strains of potato virus YN in North America. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 77, n. 1, p. 87-89, Feb. 1993.

MCDONALD, L. G.; SINGH, R. P. Host range, symptomology, and serology of isolates of Potato virus Y (PVY) that share properties with both the PVY<sup>N</sup> and PVY<sup>O</sup> strain groups. **American Potato Journal**, Orono, v. 73, p. 309-315, 1996.

NAGY, P. D.; BUJARSKI, J. J. Silencing homologous RNA recombination hot spots with GC-Rich sequences in brome mosaic virus. **Journal of Virology**, Washington, v. 72, n. 2, p. 1122–1130, 1998.

NIE, X.; SINGH, R. P. A new approach for the simultaneous differentiation of biological and geographical strains of *Potato virus Y* by uniplex and multiplex RT-PCR. **Journal of Virological Methods**, Amsterdam, v. 104, p. 41–54, 2002.

NIE, X.; SINGH, R. P. Specific differentiation of recombinant PVYN:O and PVYNTN isolates by multiplex RT-PCR. **Journal of Virological Methods**, Amsterdam, v. 113, p. 69–77, 2003.

NIKOLAEVA, O. V. et al. Epitope mapping for monoclonal antibodies recognizing tuber necrotic isolates of *Potato Virus Y*. **American Journal of Potato Research**, Orono, v. 89, n. 2, p. 121-128, 2012.

NOVAIS, C. M.; PIRES-ALVES, M. PCR em tempo real: Uma inovação da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). **Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, Tirol, v. 33, p. 10-30, jul./dez. 2004.

OSMAN, F. et al. Development and validation of a multiplex quantitative PCR assay for the rapid detection of Grapevine virus A, B and D. **Journal of Virological Methods**, Amsterdam, v. 194, n. 1/2, p. 138-145, 2013.

PELLETIER, Y. et al. A New Approach for the Identification of Aphid Vectors (Hemiptera: Aphididae) of Potato Virus Y. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 105, n. 6, p. 1909-1914, 2012.

PIRONE, T. P.; BLANC, S. Helper-dependent vector transmission of plant viruses. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 34, p. 227-247, 1996.

PRUSS, G. et al. Plant viral synergism: the potyviral genome encodes a broad range pathogenicity enhancer that transactivates replication of heterologous viruses. **Plant Cell**, Rockville, v. 9, n. 6, p. 859-868, June 1997.

QUENOUILLE, J.; VASSILAKOS, N.; MOURY, B. *Potato virus Y*: a major crop pathogen that has provided major insights into the evolution of viral pathogenicity. **Molecular Plant Pathology**, London, v. 14, n. 5, p. 439-452, 2013.

RAMALHO, T. O. **Caracterização genômica de isolados de *Potato virus Y* (PVY) e determinação do seu efeito em plantas de batata cv. Ágata**. 2012. 89 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2012.

REVERS, F. et al. Frequent occurrence of recombinant potyvirus isolates. **Journal of General Virology**, London, v. 77, p. 1953-1965, 1996.

RIECHMANN, J. L.; LAÍN, S.; GARCIA, J. A. Highlights and prospects of potyvirus molecular biology. **Journal of General Virology**, London, v. 73, p. 1-16, 1992.

RIGOTTI, S.; GUGERLI, P. Rapid identification of potato virus Y strains by one-step triplex RT-PCR. **Journal of Virological Methods**, Amsterdam, v. 140, p. 90-94, 2007.

ROJAS, M. R. et al. Capsid protein and helper component-proteinase function as potyvirus cell-to-cell movement proteins. **Virology**, New York, v. 237, p. 283-295, 1997.

SALAS, F. J. S.; LOPES, J. R. S.; FERERES, A. Resistência de cultivares de batata a *Myzuz perscicae* (Hemiptera: Aphididae). **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 39, n. 6, 2010. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1519-566X2010000600025&script=sci\\_arttext](http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1519-566X2010000600025&script=sci_arttext)>. Acesso em: 23 jan. 2015.

SANTOS, B. A. **Detecção de estirpes do *Potato vírus Y* (PVY) em plantas com infecções simples e mistas**. 2014. 64 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2014.

SAPONARI, M.; MANJUNATH, K.; YOKOMI, R. K. Quantitative detection of *Citrus tristeza virus* in citrus and aphids by real-time reverse transcription-PCR (TaqMan®). **Journal of Virological Methods**, Amsterdam, v. 147, p. 43-53, 2008.

SCHOLTHOF, K. B. G. et al. Top 10 plant viruses in molecular plant pathology. **Molecular Plant Pathology**, London, v. 12, n. 9, p. 938-954, 2011.

SHUKLA, D. D. et al. A Novel Approach to the Serology of Potyviruses Involving Affinitypurified Polyclonal Antibodies Directed towards Virus-specific N Termini of Coat Proteins. **Journal of General Virology**, London, v. 70, p. 13-23, 1989.

SHUKLA, D. D.; WARD, C. W.; BRUNT, A. A. **The potyviridae**. Wallingford: CAB International, 1994. 516 p.

- SHUKLA, D. D.; WARD, C. W. Identification and classification of potyviruses on the basis of coat protein sequence data and serology. **Archives of Virology**, Wien, v. 106, p. 171-200, 1989.
- SILVA, O. A. et al. Caracterização biológica de onze isolados de PVX (*Potato virus X*) do Brasil. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 29, n. 3, p. 521-527, maio/jun. 2005.
- SIMON, A. E.; BUJARSKI, J. J. RNA-RNA recombination and evolution in virus-infected plants, **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 32, p. 337-362, 1994.
- SINGH, M. et al. Optimization of a Real-Time RT-PCR Assay and its Comparison with ELISA, Conventional RT-PCR and the Grow-out Test for Large Scale Diagnosis of Potato virus Y in Dormant Potato Tubers. **American Journal of Potato Research**, Orono, v. 90, p. 43–50, 2013.
- SINGH, R. P. et al. Discussion paper: The naming of potato virus Y strains infecting potato. **Archives of Virology**, Wien, v. 153, p. 1–13, 2008.
- SINGH, R. P. et al. Possible escape of a recombinant isolate of Potato virus Y by serological indexing and methods of its detection. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 87, p. 679-685, 2003.
- SIRINIVASAN, R.; ALVAREZ, J. M. Effect of mixed viral infections (Potato Virus Y–Potato Leafroll Virus) on biology and preference of vectors *Myzus persicae* and *Macrosiphum euphorbiae* (Hemiptera: Aphididae). **Journal of Economic Entomology**, College Park, v. 100, n. 3, p. 646-655, 2007.
- SMITH, K. M. On the composite nature of certain potato virus disease of the mosaic group as revealed by the use of plant indicators and selective methods of transmission. **Proceedings of the Royal Society**, London, v. 109, p. 251-267, 1931.
- SOARES, E. Batata: sanidade garante qualidade e lucro. **Revista Produz**, Goiânia, v. 7, n. 73, p. 68-72, 2012.

- SOUZA-DIAS, J. A. C.; IAMAUTI, M. T. Doenças da batateira. In: KIMATI, H. et al. (Ed.). **Manual de fitopatologia**. 3. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1997. v. 2, cap. 14, p. 137-164.
- SYLLER, J. Facilitative and antagonistic interactions between plant viroes in mixed infections. **Molecular Plant Pathology**, London, v. 13, n. 2, p. 204-216, 2012.
- SYLLER, J.; GRUPA, A. The effects of co-infection by different *Potato virus y* (PVY) isolates on virus concentration in solanaceous hosts and efficiency of transmission. **Plant Pathology**, Oxford, v. 63, p.466-475, 2014.
- TANG, J. et al. Sensitive detection of Tomato ringspot virus by real-time TaqManRT-PCR targeting the highly conserved 3'-UTR regionet. **Journal of Virological Methods**, Amsterdam, v. 201, p. 38-43, 2014.
- TAVARES, S.; CASTRO, P. R. C.; MELO, P. C. T. **Cultura da batata**. 2. ed. Piracicaba: ESALQ-USP, 2002. (Série Produtor Rural, 18).
- TIAN, Y. P.; VALKONEN, J. P. T. Recombination of strain O segments to HCpro-encoding sequence of strain N of *Potato virus Y* modulates necrosis induced in tobacco and in potatoes carrying resistance genes *Ny* or *Nc*. **Molecular Plant Pathology**, London, v. 16, n. 7, p. 735-747, 2015.
- TRIBODET, M. et al. Characterization of Potato virus Y (PVY) molecular determinants involved in the vein necrosis symptom induced by PVYN isolates in infected *Nicotiana tabacum* cv. Xanthi. **Journal of General Virology**, London, v. 86, p. 2101–2105, 2005.
- URCUQUI-INCHIMA, S.; HAENNI, A. L.; BERNARDI, F. Potyvirus proteins: a wealth of functions. **Virus Research**, Amsterdam, v. 74, n. 1/2, p. 157-175, Apr. 2001.
- VALKONEN, J. P. T. Viruses: economical losses and biotechnological potential. In: VREUGDENHIL, D. et al. (Ed.). **Potato biology and biotechnology: advances and perspectives**. Amsterdam: Elsevier, 2007. p. 619-641
- VERCHOT, J.; CARRINGTON, J. Evidence that the Potyvirus P1 proteinase functions in *trans* as an accessory factor for genome



amplification. **Journal of Virology**, Washington, v. 69, n. 6, p. 3668–3674, 1995.

WALSH, K. et al. Detection of different strains of *Potato virus Y* and their mixed infections using competitive fluorescent RT-PCR. **Journal of Virological Methods**, Amsterdam, v. 91, p. 167–173, 2001.

WANG, B. et al. Potato viruses in China. **Crop Protection**, Guildford, v. 30, p. 1117-1123, 2011.

WARD, E. et al. Plant pathogen diagnostics: immunological and nucleic acid-based approaches. **Annals of Applied Biology**, Warwick, v. 145, p. 1-16, 2004.

WATSON, M. A.; ROBERTS, F. M. A comparative study of the transmission of *Hyoscyamus virus 3*, potato virus Y and cucumber virus 1 by the vectors *Myzus persicae* (Sulz), *M. circumflexus* (Buckton), and *Macrosiphum gei* (Koch). **Proceedings of the Royal Society**, London, v. 127, p. 543-576, 1939.

WEI, T. et al. Formation of complexes at Plasmodesmata for Potyvirus Intercellular movement is mediated by the viral protein P3N-PIPO. **PLoS Pathogens**, San Francisco, v. 6, n. 6, jun. 2010. Disponível em: <<http://journals.plos.org/plospathogens/article?id=10.1371/journal.ppat.1000962#references>>. Acesso em: 23 fev. 2015.

WOROBAY, M.; HOLMES, E. C. Evolutionary aspects of recombination in RNA viroses. **Journal of General Virology**, London, v. 80, p. 2535-2543, 1999.

YARDIMCI, N.; KILIÇ, H. Ç.; OZDEMIR, T. Detection of PVY (*potato y potyvirus*), on potato cultivars using biological and molecular methods growing in south-west turkey. **The Journal of Animal & Plant Sciences**, Lahore, v. 24, n. 5, p. 1525-1530, 2014.