

**CARACTERIZAÇÃO DE ISOLADOS DE *Potato*
virus Y (PVY) DE MINAS GERAIS E
AVALIAÇÃO DA DISSEMINAÇÃO DO VÍRUS E
DE RESÍDUOS DE INSETICIDAS EM
TUBÉRCULOS DE BATATA APÓS O
CONTROLE DE VETORES**

FRANCISCO DE ASSIS CÂMARA RABELO FILHO

2008

FRANCISCO DE ASSIS CÂMARA RABELO FILHO

**CARACTERIZAÇÃO DE ISOLADOS DE *Potato virus Y* (PVY) DE
MINAS GERAIS E AVALIAÇÃO DA DISSEMINAÇÃO DO VÍRUS E DE
RESÍDUOS DE INSETICIDAS EM TUBÉRCULOS DE BATATA APÓS
O CONTROLE DE VETORES**

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

Orientadora
Prof. Dra. Antônia dos Reis Figueira

LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL
2008

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca Central da UFLA**

Rabelo Filho, Francisco de Assis Câmara

Caracterização de isolados de *Potato virus Y* (PVY) de Minas Gerais e avaliação da disseminação do vírus e de resíduos de inseticidas em tubérculos de batata após o controle de vetores / Francisco de Assis Câmara Rabelo Filho. – Lavras : UFLA, 2008.

101 p.: il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2008.

Orientador: Antônia dos Reis Figueira.

Bibliografia.

1. PVY. 2. Disseminação. 3. Inseticidas. 4. Caracterização molecular. 5. Resíduos de inseticidas I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 635.2193

FRANCISCO DE ASSIS CÂMARA RABELO FILHO

**CARACTERIZAÇÃO DE ISOLADOS DE *Potato virus Y* (PVY) DE
MINAS GERAIS E AVALIAÇÃO DA DISSEMINAÇÃO DO VÍRUS E
DE RESÍDUOS DE INSETICIDAS EM TUBÉRCULOS DE BATATA
APÓS O CONTROLE DE VETORES**

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

APROVADA em 4 de julho de 2008

Prof. Dr. Ricardo Magela de Souza

UFLA

Dr. Joaquim Gonçalves de Pádua

EPAMIG

Profª. Dra. Antônia dos Reis Figueira
UFLA
(Orientadora)

LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL

Aos meus pais, Francisco de Assis e Maria Susete, pelo apoio e ensinamentos durante todo o decorrer da minha caminhada acadêmica e por sempre estarem presentes em todos os momentos dessa caminhada sempre dando força e apoio.

OFEREÇO

A Deus, fonte maior de ensinamento e pela presença na realização deste trabalho, sempre presente, dando-me força nos momentos de dificuldade.

Aos meus avós, José Borges, Maria Nazaré, Elpídio Câmara e Francisca de Oliveira, pelo exemplo de sabedoria, amor a família e fé em dias melhores.

Aos meus irmãos, Yzy, Elpídio e Yls, pelo apoio e amizade durante toda a realização dessa etapa acadêmica, sempre presente nos momentos árdus da caminhada.

À grande amiga Karina, pelos momentos de apoio, sempre de modo incondicional, durante esses oito anos de amizade, pela enorme contribuição nas análises estatísticas e na condução dos experimentos.

À amiga Valquíria, pelo apoio dado durante o experimento de molecular, sempre ajudando e transmitindo conhecimentos, sábia e pacientemente.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Lavras e à Coordenação do Programa de Pós Graduação em Fitopatologia, pela oportunidade de realizar o mestrado.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudos.

À professora Antônia dos Reis Figueira, pela orientação segura, amizade, paciência durante a realização do curso e pelos aniversários surpresa em sua casa.

Ao professor Ricardo Magela de Souza e ao pesquisador Joaquim Gonçalves de Pádua, pela participação na banca e sugestões transmitidas.

Ao professor Magno Antônio Patto Ramalho, pela disponibilidade em ceder a área para a realização de parte dos experimentos e pelas sugestões agronômicas durante a realização do experimento de campo.

Ao professor Geraldo Andrade de Carvalho, pelas sugestões dadas no decorrer do experimento de campo.

Ao professor Renê de Oliveira Rigitano, pelas análises de resíduo e pelos conhecimentos transmitidos.

À Eveline de Oliveira, Eduardo Colombo e Márcio Barbosa pelas correções de português, tradução de inglês e referências bibliográficas, respectivamente.

Ao professor José Albérico de Araújo Lima, pela orientação durante o período de graduação e pelo exemplo de profissional competente e dedicado à pesquisa.

À professora Maria Nenmaura Gomes Pessoa, por ter me iniciado na pesquisa científica.

Aos professores da Universidade Federal do Ceará (UFC): Francisco Válder Vieira, Carmem Dolores Gonzaga Santos, Francisco Ivaldo Oliveira Melo, Sebastião Medeiros Filho, Ervino Bleicher, Francisco

Marcus Lima Bezerra e Teógenes Senna de Oliveira, pelos conhecimentos repassados no decorrer da graduação em Agronomia.

Ao amigo Jean, pelos momentos de ensinamentos durante a graduação em Agronomia e pela sincera amizade durante esses anos todos e ao amigo Sidney, pela amizade verdadeira.

Aos amigos Everton Nogueira, Roberto Cláudio, Ana Lúcia, Mauro Reges, Aline Kelly e Levi Gonçalves pelos momentos de confraternização.

Aos meus tios Maria do Socorro, Francisco Granjeiro, Bosco Câmara, Fátima Câmara e José de Arimatéia, por sempre estarem disponíveis e por serem pessoas brilhantes.

À dona Ilzete Fernandes, exemplo de pessoa dedicada à família.

Aos técnicos Raimundo (Genética), Carlos Roberto (Carzim, Fitopatologia) e Leo (Genética), pela disponibilidade em ajudar, sempre quando necessário, na realização dos experimentos.

Aos amigos do Laboratório de Virologia Vegetal: Luciene, Rejane, João, Sílvia, Samuel, Márcia, Jaciara, Charles, Bruno, Cleiton, Tais, Priscila e Suellen, pela convivência e por terem ajudado na montagem dos experimentos.

A todos os colegas de curso, pela convivência no decorrer desse tempo.

E a todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

RESUMO	i
ABSTRACT	iii
CAPÍTULO 1	1
1 Introdução geral.....	2
2 Referencial teórico	4
2.1 A cultura da batata no Brasil e no mundo	4
2.2 Disseminação e perdas ocasionadas pelas principais doenças viróticas na cultura da batata.....	6
2.3 <i>Potato virus Y</i> (vírus Y da batata)	8
2.4 Caracterização molecular	9
2.4.1 Genoma do PVY	10
2.5 Caracterização biológica e transmissão do PVY por afídeos.....	12
2.6 Métodos de controle e análise de resíduo.....	15
3 Referências Bibliográficas	20
CAPÍTULO 2: Caracterização de isolados <i>de Potato virus Y</i> (PVY) das principais regiões produtoras de batata de Minas Gerais	30
Resumo.....	31
Abstract	33
1 Introdução.....	35
2 Material e Métodos.....	39
2.1 Localização do experimento.....	39
2.2 Origem, obtenção e armazenamento dos isolados de PVY.....	39
2.3 Diagnóstico sorológica e molecular do PVY em batata	39
2.3.1 Teste DAS-ELISA.....	41
2.3.2 Discriminação e identificação dos isolados de PVY por RT-PCR	41

2.3.2.1 Extração do RNA total dos isolados de PVY	42
2.3.2.2 Síntese do cDNA	43
2.3.2.3 Reação de PCR.....	43
2.4 Inoculação mecânica de isolados de PVY em diversas espécies de plantas.....	44
2.5 Amplificação e seqüenciamento do gene da capa protéica dos isolados de PVY por RT-PCR.....	44
2.6 Seqüenciamento e análise das seqüências	45
3 Resultados e Discussão	47
3.1 Diagnose e identificação dos isolados de PVY	47
3.2 Inoculação em diversas hospedeiras.....	49
3.3 Caracterização molecular dos 14 isolados estudados.....	56
4 Conclusões.....	68
5 Referências Bibliográficas	69
CAPÍTULO 3: Avaliação da disseminação do <i>Potato virus Y</i> (PVY) e de resíduos de inseticidas em tubérculos de batata, após o controle de vetores	76
Resumo	77
Abstract	79
1 Introdução.....	81
2 Material e Métodos.....	83
2.1. Modelo e local do experimento	83
2.2 Avaliação da produção	86
2.3 Procedimentos laboratoriais	87
2.3.1 DAS-ELISA	87
2.3.2 Análise de resíduos.....	87

3 Resultados e discussão	89
3.1 Avaliação da produção	89
3.2 Avaliação dos níveis de resíduo	96
4 Conclusões.....	98
5 Referências Bibliográficas	99

RESUMO

RABELO FILHO, Francisco de Assis Câmara. **Caracterização de isolados de *Potato virus Y* (PVY) de Minas Gerais e avaliação da disseminação do vírus e de resíduos de inseticidas em tubérculos de batata após o controle de vetores.** 2008. 101p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.*

Com a importação de sementes de diversos países, pelo Brasil e devido ao meio de propagação vegetativa da batata, a ocorrência de vírus no campo é dinâmica e frequentemente aparecem novos isolados mais agressivos e mais facilmente dissemináveis no campo. Assim sendo, cada vez mais têm sido utilizados inúmeros produtos inseticidas para o controle dos vetores que disseminam esses vírus no campo, com riscos constantes de deixar nos tubérculos resíduos nocivos à saúde humana. Neste trabalho fez-se um levantamento nas principais regiões produtoras do estado de Minas Gerais, com a finalidade de caracterizar, biológica e molecularmente, os isolados virais presentes no campo na safra de 2007. Na caracterização biológica, foram utilizadas espécies de três famílias botânicas: *Solanaceae*, *Amaranthaceae* e *Chenopodiaceae*, com enfoque especial às espécies de fumo *Nicotiana tabacum* cv. TNN e *N. tabacum* cv. White Burley, por serem geralmente empregadas na distinção das estirpes do PVY. A caracterização molecular foi feita empregando-se um conjunto de *primers* específicos para diferenciação de isolados por RT-PCR e um par de *primers* desenhados para amplificar o gene da capa protéica, que foi seqüenciada e analisada. A comparação entre as seqüências de nucleotídeos e de aminoácidos foi feita com 24 isolados de PVY, escolhidos entre os disponíveis no GenBank. Foi também realizado um experimento de campo, seguindo o manejo adotado por produtores de batata consumo para o controle químico de vetores, avaliando-se, posteriormente, a ocorrência de resíduos nos tubérculos de batata produzidos. Foram utilizados dois tratamentos de sulco combinados com quatro diferentes inseticidas para pulverizações foliares e uma testemunha, sem tratamento. As plantas de *Gomphrena globosa*, *Datura stramonium*, *Chenopodium quinoa* e *Nicandra physaloides* foram imunes a todos os catorze isolados e as demais espécies inoculadas apresentaram sintomas cuja severidade variou com o isolado inoculado. Os resultados dos testes biológicos, de PCR e os do seqüenciamento mostraram que todos os isolados de PVY pertenciam à estirpe necrótica, sendo que metade delas se tratava do variante PVY^{NTN}. Comparando-se à seqüência de nucleotídeos, as

*Orientadora: Antônia dos Reis Figueira - UFLA

identidades entre os 14 isolados variaram entre 87% e 99%. Entre esses e os isolados do GenBank, a variação foi de 86% a 99%. O mesmo foi observado quando os isolados do GenBank foram comparados entre si. No alinhamento múltiplo de aminoácidos, a identidade entre os 14 isolados brasileiros foi de 83% a 98% e entre esses e os do GenBank foi de 86% a 99%. A identidade entre os isolados do GenBank ficou entre 91% e 100%. As árvores filogenéticas construídas com base no alinhamento de nucleotídeos e de aminoácidos mostraram uma distribuição dos isolados brasileiros em dois grupos distintos, um contendo os PVY^{NTN} (SGT-AG, TAP-AG, SAT-AG, IPU-MA, ALF-VI, ARA-MO e COR-AG) e outro, os isolados PVY^N (MFE-AG, BRE-EM, LUM-CE, FOR-AG, SGS-AG, LAV-CL e POL-AG). Quando os nucleotídeos e os aminoácidos foram alinhados com os 24 isolados do GenBank, ALF-VI, ARA-MO e COR-AG formaram um clado distinto dentro do grupo dos PVY^{NTN} e BRE-EM e MFE-AG no grupo da estirpe necrótica comum, mostrando distanciamento entre eles e os demais. Os dados indicaram que a variante NTN está aumentando a sua ocorrência em diversas partes do estado, o que acarreta prejuízos maiores, por causarem anéis necróticos nos tubérculos, depreciando-os para o comércio. No teste com os inseticidas, os diferentes tratamentos não impediram a disseminação do PVY no campo, provavelmente devido ao alto índice inicial de vírus nas sementes. Isso demonstra a importância de se empregar sementes livres de vírus para o estabelecimento da cultura. Os diversos tratamentos não deixaram resíduos nos tubérculos, indicando que a concentração do inseticida indicada pelo fabricante é segura para o consumidor.

ABSTRACT

RABELO FILHO, Francisco de Assis Câmara. **Characterization of *Potato virus Y (PVY)* isolates and evaluation of virus dissemination and of insecticides residues in potato tubers after vector control.** 2008. 100p. Dissertation (Master on Science in Phythopathology) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.*

Due to the Brazilian import of potato seeds from several countries, associated with the vegetative propagation of potato plants, the occurrence of virus in the field is quite dynamic. It often allows the appearance of new and more aggressive virus isolates, which besides increasing the tuber losses spreads damages more easily in the field. Therefore, the use of several chemical insecticides to control the virus vectors has increased, making the risk of insecticides residue higher, unsafe for human and animal healthy, remaining on the potato tubers. This work carried out a survey in the main potato field regions of Minas Gerais State- Brazil, with the purpose of characterizing biologically and molecularly the virus isolates infecting potato plants in the year of 2007. In the biological characterization species of three botanic families were used: *Solanaceae*, *Amaranthaceae* and *Chenopodiaceae*, with a special focus on the tobacco species: *Nicotiana tabacum* cv. TNN and *N. tabacum* cv. White Burley because they have been employed to discriminate PVY strains. The molecular characterization was done by using a set of *primers*, specific for PVY strain discrimination by RT-PCR, and a pair of primers settled to amplify the coat protein gene, which was sequenced and analyzed. The comparison of the nucleotides and amino acids sequences was done with 24 PVY isolates, chosen among those available in GenBank. A field experiment was also carried out, following the techniques adopted by potato growers for the chemical control of virus vectors, in order to evaluate the virus spread and the occurrence of residue on potato tubers produced. The experiment was accomplished with potato cultivar Agata, using two soil treatments combined with four different insecticides for leaves spraying, and one control without any treatment. The *Gomphrena globosa*, *Datura stramonium*, *Chenopodium quinoa* and *Nicandra physaloides* plants were immune to all of the fourteen isolates. The symptoms shown by other inoculated species had different severity degrees, which changed according to the inoculated virus isolate. The results of the mechanical inoculation, PCR and coat protein gene analysis showed that all the fourteen studied PVY isolates were necrotic strain, but half of them was a PVY^{NTN}

*Major professor: Antônia dos Reis Figueira - UFLA.

variant. Comparing the nucleotide sequence, the identities among the 14 isolates ranged between 87 and 99%. When compared with the PVY isolates from GenBank, the variation was between 86% and 99%. The same was found when the GenBank isolates were compared among themselves. The identity of amino acids among Brazilian isolates ranged from 83% to 98% and among them and the GenBank PVY isolates was between 86% and 99%. The identity among the GenBank PVY isolates was between 91% and 100%. The phylogenetic trees based on nucleotide and amino acid sequences showed a distribution of the Brazilian isolates into two distinct groups, one containing PVY^{NTN} (SGT-AG, TAP-AG, SAT-AG, IPU-MA, ALF-VI, ARA-MO and COR-AG) and the other PVY^N isolates (MFE-AG, BRE-EM, LUM-CE, FOR-AG, SGS-AG, LAV-CL and POL-AG). When both nucleotide and amino acid sequences were aligned with the 24 GenBank isolates, ALF-VI, ARA-MO and COR-AG isolates joined distinct subgroups within PVY^{NTN} group. BRE-EM and MFE-AG joined the group of the necrotic strain, but were distant from the other Brazilian PVY isolates. The data pointed out that the occurrence of PVY^{NTN} variant has increased in several parts of Minas Gerais State, which brings about greater losses because it induces necrotic rings on the tubers, making them improper for commercialization. In the test with the insecticides, the different treatments did not prevent the spread of PVY in the field, probably because of the high virus incidence on the seeds. It demonstrates the importance of potato virus-free seeds to guarantee the crop profitability. The several insecticide treatments have left no residue on the tubers suggesting that the insecticides concentration advised by the manufacturer is safe to the consumer.

CAPÍTULO 1: Introdução geral e referencial teórico

1 INTRODUÇÃO GERAL

A batata é a hortaliça mais plantada no Brasil, com grande expansão econômica em vários estados, como Minas Gerais, São Paulo, Paraná, Santa Catarina, Rio Grande do Sul, Goiás e Bahia. No entanto, um dos fatores limitantes à produção é a incidência de doenças na cultura, entre as quais as de etiologia viral ocupam lugar de destaque, uma vez que acarretam perdas consideráveis à produção de tubérculos. Dentre as doenças viróticas, o *Potato virus Y* (PVY) tem se destacado, pois, além de causar perdas significativas na qualidade e na quantidade de produção, ainda pode ser rapidamente disseminado no campo. Sua incidência tem sido maior que a de outros vírus também importantes, como o *Potato leafroll virus*, PLRV (Souza-Dias et al., 1995; Figueira et al., 1996a; Souza-Dias & Tristão, 1997; Figueira, 2002).

O PVY pertence ao gênero *Potyvirus*, família *Potyviridae*, e tem sido classificado em três principais grupos de estirpes: nos dois primeiros grupos, a estirpe comum (PVY^O), que causa mosaico sistêmico e a estirpe necrótica (PVY^N), que causa mosaico e necrose em plantas de fumo (*Nicotiana tabacum* L.); no terceiro grupo, a estirpe denominada de PVY^C, induz sintomas do tipo “stipple streak” em cultivares de batata que possuem o gene *Nc* (De Bokx & Huttinga, 1981; Camargos et al., 2007). A PVY^N possui, ainda, uma estirpe variante, que causa anéis necróticos em tubérculos de batata, denominada de PVY^{NTN}, que chegou recentemente ao Brasil (Souza-Dias et al., 1998, 1999) e tem sido detectada em vários estados, tais como Santa Catarina, São Paulo, Minas Gerais (Fonseca, 2003; Fonseca et al., 2005; Ávila et al., 2007), Paraná, Espírito Santo, Goiás e Bahia (Ávila et al., 2007).

A disseminação do PVY é feita por meio de afídeos, de modo não persistente ou estiletar, dentre os quais o *Myzus persicae* se destaca pela eficiência na transmissão (Costa et al., 1960; De Bokx & Huttinga, 1981;

Sigvald, 1984; Piron, 1986). Como as fitoviroses não possuem controle curativo, as medidas de controle devem ser de caráter preventivo, destinado a eliminar e ou a evitar fontes de inóculo e impedir a transmissão, bem como a disseminação dos vírus por meio do vetor. Desse modo, o uso indiscriminado de inseticidas no controle dos vetores tem sido uma constante nos campos cultivados com batata, pois os produtores nem sempre se baseiam em subsídios obtidos por meio de estudos apropriados. Isso leva ao risco do aparecimento de resíduos nos tubérculos produzidos para consumo, que podem ser tóxicos à saúde humana e animal.

Com o objetivo de obter subsídios para incrementar as medidas de manejo do PVY no campo, no presente trabalho foi feito um levantamento dos isolados virais que se encontravam nos campos de batata-semente e para consumo, no ano de 2007, nas principais regiões produtoras de Minas Gerais. Além de fazer a caracterização biológica e molecular desses isolados de PVY, foi instalado experimento de campo para verificar o efeito de tratamentos com inseticidas, de diferentes grupos químicos, na disseminação do vírus em batata cv. Ágata. O teor de resíduos dos mesmos, nos tubérculos produzidos pelas plantas tratadas, foi também determinado.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 A cultura da batata no Brasil e no mundo

A batata é um dos alimentos mais nutritivos e versáteis do mundo. Mesquita et al. (1999) salientam que uma produtividade média de $13,3t.ha^{-1}$ de batata fornece 280 kg de proteína. ha^{-1} . Cerca de 77% do tubérculo de batata é constituído por água e de 19% a 20% por carboidratos, destacando-se o amido e os açúcares (Fontes, 2005). Adicionalmente, além de ser um alimento com baixo teor de lipídeos e isento de colesterol, apresenta também, em sua composição, sódio e potássio, além de vitaminas, como a vitamina C. A batata apresenta também propriedades nutracêuticas, atuando em enfermidades como o câncer, diabetes, doença celíaca e no controle da pressão arterial, reduzindo possíveis riscos coronarianos (Pereira et al., 2005).

O plantio de batata (*Solanum tuberosum* L.) teve início há oito mil anos nas montanhas andinas, tendo sido posteriormente levado para a Europa por Francisco Pizarro. A partir da Espanha, disseminou-se por todo o continente europeu (Mascarenhas et al., 1999). Esta hortaliça se adaptou com rapidez às condições climáticas do hemisfério norte, estabelecendo-se como alimento básico numa época de acelerado crescimento demográfico. Da Europa seguiu para outras partes do mundo, de modo que hoje se produz batata numa área estimada em 180 mil quilômetros quadrados (Food and Agriculture Organization - FAO, 2007).

A cultura da batata ocupa a quarta posição, em importância econômica no mundo, com produção anual de mais de 321 milhões de toneladas. A Ásia é o maior continente produtor (42,14%), seguida pela Europa (40,22%) e pelos continentes americano (12,04%) e africano (5,07%). No continente americano, destacam-se as Américas do Norte e do Sul, com 7,03% e 4,28% da produção mundial, respectivamente (FAO, 2008). Em 2007, foram plantados cerca de

16,74 milhões de hectares de batata no mundo, com produção de mais de 321 milhões de toneladas, o que representa uma produtividade média de 19,20 t.ha⁻¹ (FAO, 2008). A China é o maior produtor dessa olerícola, com cerca de 72 milhões de toneladas, seguida por Rússia, Índia, Ucrânia e Estados Unidos, com produção de, aproximadamente, 37, 26, 19, e 18 milhões de toneladas, respectivamente (FAO, 2008). Na América do Sul, o Brasil é o maior produtor (3,39 milhões de toneladas anuais), seguido de perto pelo Peru, que responde por 3,38 milhões de toneladas. O Brasil ocupa a 17ª posição no ranking mundial dos países produtores de batata (FAO, 2008).

Embora a maior parte da produção mundial de batata ainda venha da Ásia e da Europa, outros países em desenvolvimento têm aumentado a sua participação. Isso se deve ao fato de que, nos últimos anos, os países em desenvolvimento têm estado mais dispostos a aceitar a introdução de novas variedades. Além disso, o melhoramento genético, juntamente com uma produção mais eficiente e com programas de distribuição de batatas-sementes, tem contribuído para melhorar os níveis de produtividade (FAO, 2007).

No Brasil, segundo dados estimados de 2007, as maiores regiões produtoras são Sudeste, Sul e Nordeste, sendo as duas primeiras, representadas pelos estados de Minas Gerais, São Paulo, Espírito Santo, Paraná, Rio Grande do Sul e Santa Catarina, responsáveis por cerca de 86% da produção nacional. Minas Gerais é o maior estado produtor, contribuindo com 60% da produção da região Sudeste, o que corresponde a 1/3 da produção nacional, ou seja, aproximadamente 1,1 milhão de toneladas anuais, seguido por São Paulo e Paraná, que produzem em torno de 751 mil e 611 mil toneladas, respectivamente (Agrianual, 2008). Destaque tem sido dado às regiões do Triângulo Mineiro e do Alto do Paranaíba, consideradas áreas bastante promissoras, devido a fatores como topografia, solos favoráveis à mecanização da cultura, disponibilidade de

água para irrigação e localização geográfica favorável ao escoamento da produção (Mascarenhas et al., 1999; Faria et al., 2001).

2.2 Disseminação e perdas ocasionadas pelas principais doenças viróticas na cultura da batata

A cultura da batata, como as demais olerícolas, é muito susceptível ao ataque de fitopatógenos. As doenças de etiologia viral têm merecido destaque, pois, devido ao método de propagação vegetativa da batata, elas são perpetuadas por meio do tubérculo, o que contribui para aumentar a sua incidência a cada plantio (Costa, 1965; Beemster & De Bokx, 1987).

Existem em torno de 70 doenças relatadas para a cultura da batata e, dentre essas, pelo menos 25 são causadas por vírus e uma por viróide (Hooker, 1981; Beemster & De Bokx, 1987). No Brasil, as principais doenças causadas por fitovírus na cultura de batata são: o enrolamento da folha da batata (*Potato leafroll virus* - PLRV), o vírus Y da batata (*Potato virus Y* - PVY) e os latentes vírus X (*Potato virus X* - PVX) e o vírus S (*Potato virus S* - PVS) (Daniels, 1995; Figueira, 1995; Hirano, 1995; Lima, 1995; Souza-Dias, 1995; Salas, 2004). Porém, os que têm sido mais associados à degenerescência da batata no Brasil, devido à sua alta incidência no campo, são o PLRV e o PVY (Câmara et al., 1986; Figueira, 1995; Souza-Dias, 1995).

Durante muito tempo, o PLRV era o principal vírus responsável pela degenerescência das batatas produzidas em território nacional (Costa, 1965; Cupertino & Costa, 1970; Souza-Dias et al., 1984, 1990; Figueira & Pinto 1995; Souza-Dias, 1996). Entretanto, em meados de 1994-95, o PVY tornou-se o vírus mais importante para o Brasil, devido à introdução de estirpes mais agressivas, por meio de batata-semente importada (Figueira & Pinto, 1995; Figueira et al., 1996a,b; Moraes et al., 1997), de modo que o produtor brasileiro passou a ser

onerado por novas perdas causadas por doenças viróticas. Atualmente, o PVY é mais importante que o PLRV (Figueira, 1999; 2002).

Vários são os trabalhos que relatam as perdas causadas pelas doenças viróticas, em diferentes cultivares de batata (Cupertino & Costa, 1970; Lima & Hamerschmidt, 1982; Câmara et al., 1986; Marton et al., 1993; Figueira et al., 1996a,b). Cupertino & Costa (1970) observaram redução média de 74,1% e 97,1% no peso dos tubérculos graúdos, infectados com o PLRV, das cultivares Delta A e Gunda, respectivamente.

Plantas de batata infectadas com PVY também podem apresentar perdas significativas, que variam de 10% a 80%, dependendo da cultivar de batata, da época em que esta foi infectada e da estirpe do vírus (De Bokx & Huttinga, 1981). Lima & Hamerschmidt (1982) observaram que uma incidência de 0,5% de PVY e de 7,4% de PLRV + PVY na batata-semente foi capaz de provocar 16,7% e 51,1%, respectivamente, de redução na produção total de tubérculos em plantas de batata cv. Delta. Câmara et al. (1986) observaram redução média de 43,2% na produção de tubérculos de 4 cultivares de batata com média de 80,3% de PLRV e 49,6% de PVY, em relação às batatas-sementes certificadas com 2,1% de PLRV e 6,5% de PVY. Marton et al. (1993) encontraram redução de 67,1% na produção de batata cv. Achat e de 57,92% na cv. Baronesa, quando estas eram provenientes de batata-semente com 100% de infecção. Figueira et al. (1996b), estudando um novo isolado da estirpe necrótica do PVY, observaram que as plantas de batata da cv. Achat, provenientes de batatas-sementes infectadas, apresentaram redução de 23,9% no número e de 45,3% no peso dos tubérculos produzidos, em relação às plantas sadias.

A velocidade de degenerescência também varia com a cultivar e as condições ambientais. Andrade & Figueira (1991) estudaram a incidência do PLRV e do PVY em três gerações sucessivas, em seis cultivares de batata plantadas em Maria da Fé (MG): 'Achat', 'Baraka', 'Baronesa', 'Bintje',

‘Granola’ e ‘Monalisa’. Da primeira para a segunda geração, a cultivar Bintje aumentou a incidência de PLRV de 29,1% para 90,9%, enquanto a ‘Monalisa’ aumentou de 10,7% para 24,4%, respectivamente. No caso do PVY, as incidências das gerações F₁, que eram de 16,7% e 15%, aumentaram para 90,0% e 83,9% nas cultivares Bintje e Baraka, respectivamente, na geração F₃.

Isolados de PVY introduzidos em meados dos anos 1990 têm se mostrado ainda mais facilmente dissemináveis no campo. Figueira et al. (1996b) observaram que o novo isolado PVY^N, detectado em 1994, em Minas Gerais, na cultivar Achat, que até então era resistente ao PVY, apresentava alta disseminação no campo, sendo capaz de chegar a 50% e 90% de incidência nas segundas e nas terceiras gerações, respectivamente.

Esses resultados demonstram a importância do uso de batata-semente com boa qualidade sanitária, principalmente no Brasil, que apresenta clima ideal para a ocorrência de altas densidades populacionais de afídeos, favorecendo a disseminação desses vírus dentro e fora da cultura.

2.3 *Potato virus Y* (vírus Y da batata)

O vírus Y da batata (PVY) é o membro tipo do gênero *Potyvirus*, família *Potyviridae* e possui RNA fita simples, com partículas medindo aproximadamente 730 nm de comprimento e cerca de 11 nm de diâmetro (Delgado-Sanchez & Grogan, 1970; De Bokx & Huttinga, 1981; Hooker, 1981; Shukla et al., 1994; Kerlan, 2006). Apresenta algumas propriedades físicas, como: ponto de inativação térmica (PIT) entre 50° e 62°C; ponto máximo de diluição (PMD) entre 10⁻² e 10⁻⁶ e longevidade “in vitro” (LIV) de 7 a 50 dias, à temperatura de 18° a 22°C (De Bokx & Huttinga, 1981).

2.4 Caracterização molecular

De modo geral, os testes moleculares são mais sensíveis que os sorológicos e, atualmente, vêm sendo cada vez mais empregados na diagnose de fitovírus, por apresentarem uma série de vantagens em relação aos testes sorológicos. A principal delas seria a facilidade de se produzir sondas, comparada à produção de anti-soro (Zerbini & Maciel-Zambolim, 2000).

Os métodos moleculares são usados principalmente quando ocorre alguma limitação, como no caso do geminivírus, que apresenta baixas concentrações de partículas virais em seus tecidos. Vários são os trabalhos que relatam o uso dessas técnicas para o estudo e a caracterização de fitovírus. Briosio et al. (1996) estudaram a eficiência de técnicas, como o RT-PCR e Dot-Blot, na diagnose de fitovirose em batata e Singh & Singh (1998) utilizaram a RT-PCR na detecção de *Potato virus A*, em tubérculos dormentes. Baseando-se na comparação do genoma das diferentes estirpes de PVY, Boonham et al. (2002) desenharam *primers* específicos para a sua detecção por meio de RT-PCR, sendo possível a separação entre os diferentes variantes genéticos. Esse trabalho é considerado de grande importância, pois nem sempre é possível diferenciar a estirpe necrótica da sua variante, a PVY^{NTN}, por meio de caracterização biológica. Trabalho parecido foi realizado por Fonseca et al. (2005), que empregaram *primers* específicos para diferenciar estirpes de PVY.

Alguns autores, como Le Romancer et al. (1994), citam que a variante NTN pode ser diagnosticada por métodos biológicos, empregando-se cultivares diferenciadoras, como as de pimentão ‘Bastidon’ e ‘Yolo Wonder’. Porém, nem sempre esses resultados puderam ser comprovados. Truta et al. (2004) verificaram que um isolado pertencente à estirpe necrótica comum foi capaz de induzir mosaico em ambas as cultivares, ao contrário do que foi relatado por Le Romancer et al. (1994). Da mesma forma, Palazzo (2005) observou que isolados da estirpe comum também infectaram a cultivar Yolo Wonder, ou seja,

dependendo das condições do experimento e dos isolados empregados, que geralmente são muito variáveis, pode haver uma reação diferente dessas cultivares. Portanto, o uso de técnicas moleculares tem se mostrado mais útil, principalmente quando as caracterizações sorológicas e biológicas não fornecem um resultado satisfatório.

2.4.1 Genoma do PVY

O genoma do PVY está esquematizado na Figura 1. O RNA genômico possui uma única ORF (Figura 1), que codifica 10 proteínas funcionais: P1, HC-PRO, P3, 6K1, CI, 6K2, VPg, NIa-Pro, NIb e CP (Murphy et al., 1995). As funções de cada uma das proteínas estão detalhadas na Tabela 1.

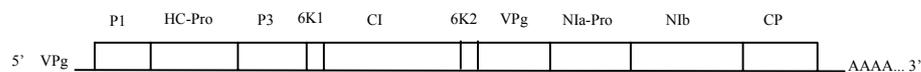


FIGURA 1 Esquema do genoma dos *Potyvirus*, indicando as proteínas codificadas.

TABELA 1 Proteínas codificadas pelo *Potato virus Y* (PVY): nome, peso molecular e suas respectivas funções.

Proteína	Peso molecular	Funções
P1	32 – 64 KDa	Proteinase serina semelhante à tripsina, de autoclivagem da extremidade C-terminal; sintomatologia; movimento célula a célula.
HC – Pro	56 – 58 KDa	Transmissão por afídeos; auto-interação; movimento sistêmico; sinergismo e desenvolvimento dos sintomas; supressão do silenciamento gênico; proteinase de cisteína semelhante à papaína de autoclivagem da região C-terminal.
P3	37 KDa	Patogenicidade da planta; replicação.
6K1		Não elucidada.
CI	70 KDa	ATPase/RNA helicase; movimento célula a célula.
6K2		Ancoramento do complexo de replicação viral na membrana.
VPg		Replicação do genoma; especificidade do genótipo hospedeiro.
NIa - Pro	49 KDa	Localização celular; Proteinase serina semelhante à tripsina, atuando em <i>Cis</i> e <i>Trans</i> ; interação proteína-proteína.
NIb	58 KDa	RNA polimerase dependente de RNA; envolvida na replicação do genoma.
CP	28 – 40 KDa	Transmissão por afídeos; movimentos sistêmicos e de célula a célula; montagem da partícula viral; replicação viral.

Fonte: Urcuqui-Inchima et al. (2001); Fonseca (2003).

2.5 Caracterização biológica e transmissão do PVY por afídeos

Existem três grupos principais de estirpes do PVY: PVY^O ou estirpe comum, PVY^N ou estirpe necrótica e PVY^C, classificadas com base nos sintomas causados em batata, fumo e *Physalis floridana* (De Bokx & Huttinga, 1981). Até o início dos anos 1990, a estirpe comum era a que predominava nos campos de produção de batata. Andrade & Figueira (1992), em levantamento realizado no Sul de Minas Gerais, empregando seis cultivares de batata, observaram que as incidências da estirpe comum variaram de 81,4% a 100%, nas cultivares Monalisa e Granola, respectivamente. A estirpe comum induz sintomas fortes em *Nicotiana glutinosa*, *Physalis floridana* e em batata (Delgado-Sanchez & Grogan, 1970). Geralmente, essa estirpe e a PVY^C causam sintomas mais severos que a estirpe necrótica. Dependendo da cultivar de batata, é caracterizado por necrose e amarelecimento e, em algumas vezes, até morte prematura, quando infectada com a estirpe comum (Hooker, 1981).

A partir de 1994, a estirpe necrótica tornou-se predominante no Brasil, devido à introdução de um isolado com alto poder de disseminação. Os sintomas apresentados pela planta de batata infectada com essa estirpe se caracterizam por um mosaico leve, às vezes quase imperceptível. Na planta de fumo, ao contrário do que se observa com a maioria dos isolados da estirpe necrótica, induz uma necrose bem mais leve. Entretanto, induz sintomas severos, seguidos de desfolha em plantas de *Physalis floridana*. Esse vírus não reagiu com o anti-soro monoclonal da Agdia para a estirpe necrótica (Moraes et al., 1999).

Um isolado semelhante foi descrito na Polônia, por Chzanowska (1991, 1994), tendo sido denominado de PVY^{N-Wi}. Esse vírus foi também associado à alta disseminação, sintomas mais suaves em fumo, e também não reagiram com anti-soro monoclonal para PVY^N. Posteriormente, foi sugerido que ele poderia ser recombinante entre as estirpes comum e necrótica (Blanco-Urgoiti et al., 1998; Kerlan et al., 1999; Glais et al., 2002, 2005). Isolados semelhantes já

foram relatados na Espanha (Blanco-Urgoiti et al., 1998), na França (Kerlan et al., 1999) e no Canadá (McDonald & Singh, 1996a). Como o Brasil importa sementes com frequência de países europeus, essa estirpe deve ter tido a mesma origem.

A estirpe C ainda não foi detectada no Brasil (Daniels, 2000; Souza-Dias 2001; Ávila et al., 2007).

Outro isolado de PVY^N, descrito pela primeira vez na Hungria, por Beczner et al. (1984), foi introduzido há pouco tempo no Brasil (Souza-Dias et al., 1998; Fonseca, 2003). Como causa anéis necróticos nos tubérculos, foi denominado de PVY^{NTN}. Esse isolado tem se disseminado rapidamente pelas regiões produtoras de batata do Brasil e a sua importância, provavelmente, tem sido subestimada. A planta infectada com esse isolado apresenta sintomas de mosaico bastante evidente, com folíolos apicais ondulados e de tamanho menor que o de plantas saudáveis. Frequentemente, nota-se o aparecimento de necroses superficiais na forma de anéis concêntricos, em tubérculos de variedades susceptíveis (Beczner et al., 1984; Le Romancer et al., 1994; Souza-Dias, 2001).

O PVY^{NTN} se diferencia dos demais isolados não somente por induzir a formação de anéis necróticos nos tubérculos, mas também pela sua capacidade de infectar algumas cultivares de pimentão (Le Romancer et al., 1994). Os sintomas de anel nos tubérculos podem ser vistos no momento da colheita, ou logo após, durante o armazenamento (Souza-Dias, 2001; Fonseca, 2003). Le Romancer et al. (1994) relatam que o NTN é incapaz de infectar *Chenopodium amaranticolor* e *Chenopodium quinoa*. Logo, essas duas espécies poderiam ser usadas como diferenciadoras entre eles e a estirpe necrótica.

McDonald & Singh (1996b) utilizaram dois isolados de PVY^{NTN} (Tu 660 e Tu 619) para estudar a reação de 19 cultivares de batata, fazendo avaliação na folhagem e nos tubérculos. As cultivares reagiram de modo diferente, mostrando: 1) sintoma na folha e no tubérculo, 2) sintoma só na folha, 3)

sintoma só no tubérculo e 4) ausência de sintoma na folha e no tubérculo das cultivares denominadas Red Gold e Redsen, quando estas foram inoculadas com o isolado (Tu 660). O mesmo não aconteceu quando essas duas cultivares foram inoculadas com o isolado (Tu 619), que induziu sintomas nas folhas e nos tubérculos, mostrando a variabilidade entre esses isolados.

Em um trabalho realizado no Japão, Ohshima et al. (2000) observaram quatro variações nos sintomas que ocorreram nos tubérculos provenientes de plantas infectadas com o PVY^{NTN}, sendo o primeiro necroses deprimidas, o segundo rachaduras e necroses no tecido interno, o terceiro manchas necróticas na superfície com necrose nos tecidos adjacentes internos e o quarto, presença de lesões necróticas em tubérculos aparentemente saudáveis. Daniels & Pereira (2004) também chamaram a atenção para o fato de que nem sempre os tubérculos mostram os sintomas característicos de lesão necrótica, dificultando a diagnose visual e aumentando as perdas de produção da batata. Essas variabilidades no tipo e na severidade dos sintomas têm sido comumente observadas nos isolados da estirpe necrótica do PVY.

Como a maioria dos fitovírus, para a sua disseminação, o PVY depende da ação de vetores, com os quais apresenta inter-relações complexas (Costa, 1998). O PVY pode ser transmitido mecanicamente, por enxertia e por, no mínimo, 25 espécies de afídeos vetores, de maneira não persistente (De Bokx & Huttinga, 1981). Isso significa que o vírus pode ser adquirido e transmitido em poucos segundos, o que demonstra a importância dos vetores no processo epidêmico. Diversas espécies de afídeos podem transmitir o PVY, entretanto, o *Myzus persicae* parece ser o mais eficiente, tanto para a estirpe necrótica (Piron, 1986) como para a comum (Sigvald, 1984).

2.6 Métodos de controle e análise de resíduo

O fato de as viroses não possuírem um método de controle curativo faz com que as medidas empregadas para o seu manejo sejam essencialmente de caráter preventivo. Assim sendo, uma das medidas mais importantes é o controle da disseminação do vírus por meio do afídeo vetor. Entretanto, sabe-se que esse controle não é uma tarefa fácil, uma vez que existem fatores agravantes, como a rapidez de transmissão e a baixa especificidade inseto-planta, ou seja, mais de um afídeo vetor, como o *Aphis craccivora*, *Aphis gossypii* e o *Myzus persicae*, pode transmitir o mesmo vírus e um único afídeo pode transmitir mais de uma espécie viral para uma determinada planta. Além disso, o fato de serem polífagos facilita a disseminação e o estabelecimento dos vírus nas hospedeiras alternativas, onde permanecem até a implantação do próximo cultivo (Weidemann, 1988; Souza-Dias et al., 1993; Figueira, 1999; Salas, 2004).

Segundo Daniels & Pereira (2004), o controle das viroses em batata é dificultado pela falta de inverno rigoroso, o que favorece a multiplicação dos vetores durante todo o ano, especialmente nas épocas próprias para o cultivo da batata. Portanto, o controle de fitovírus deve incluir diversas medidas de manejo, como: uso de material de propagação comprovadamente sadio; eliminação de plantas hospedeiras, cultivadas e selvagens; controle do inseto vetor; quando possível, evasão, ou seja, fazer o plantio em época que não há vetores na área, ou em épocas desfavoráveis ao mesmo, diminuindo, assim, a disseminação da virose e uso de cultivares resistentes ou tolerantes.

A medida de controle mais desejada seria o uso de cultivares resistentes. Entretanto, nem sempre as cultivares resistentes estão disponíveis e quando estão, a resistência apresentada pela planta acaba sendo vencida pela facilidade com que o vírus se modifica geneticamente e se torna apto a quebrar a resistência da hospedeira. Portanto, o controle químico vem sendo mais usado, pois ainda é o que gera resultados mais rápidos.

Diversos trabalhos têm investigado métodos de controle do inseto vetor, visando ao controle da disseminação das doenças viróticas, nas mais diversas culturas. Muitas vezes, o produtor aplica produtos granulados no sulco de plantio, pois, quando a planta emerge, já possui o inseticida em seus tecidos (Yoshida, 1973). Porém, é comum a aplicação de inseticidas foliares. Costa et al. (1964) obtiveram controle satisfatório do vira-cabeça-do-tomateiro, causado pelo *Tomato spotted wilt virus* (TSWV), por meio do controle do tripses com inseticidas. Boiteau & Singh (1999), observaram redução da disseminação para duas viroses em batata quando da utilização do imidacloprid. Mesmo que o controle químico seja um método eficiente para impedir a disseminação viral no campo, é necessário ter o devido cuidado com a aplicação excessiva de inseticidas, para que não ocorra resistência por parte do inseto, sendo, assim, necessário fazer uma alternância de produtos pertencentes a diferentes grupos químicos. Além disso, mesmo que em pequenas quantidades, essas substâncias químicas podem ser prejudiciais para a saúde dos consumidores (Rigitano, 1982a).

De fato, a presença de pesticidas em alimentos, em concentrações acima do permitido, constitui um importante problema toxicológico para a saúde pública (Wang, 1982). Por outro lado, é difícil imaginar e associar grandes produções e produtividades sem o uso desses insumos “protetores”. A maioria das doenças poderia constituir uma epidemia ou em algumas situações uma pandemia, sem o auxílio dos agroquímicos, mais popularmente denominados de agrotóxicos. Portanto, eles ajudam a minimizar as perdas ocasionadas não só pelas doenças, mas também pelas pragas.

O uso de defensivos agrícolas para evitar ou reduzir os prejuízos econômicos causados por pragas, doenças e plantas invasoras tem sido objeto de crescente atenção da sociedade, sobretudo quando se refere ao cultivo de alimentos. Atualmente, tem-se procurado praticar uma agricultura mais limpa e

justa, considerando o seu efeito no meio ambiente e no aspecto socioeconômico. Assim sendo, fica cada vez mais importante o monitoramento dos níveis de resíduos, nos produtos agrícolas e no ambiente propriamente dito.

O Brasil é um dos países que mais vendem defensivos agrícolas, alcançando o terceiro maior mercado de vendas no mundo, com, aproximadamente, 400 ingredientes ativos registrados (Caldas et al., 2004). A estabilidade de certos agroquímicos e o fato de os resíduos poderem continuar nos alimentos aumentam o risco à saúde humana. O grupo dos inseticidas apresenta um risco maior, tendo em vista que a maioria dos produtos disponíveis se enquadram nas classes toxicológicas I e II (Associação Nacional de Defesa Vegetal - ANDEF, 2008) e a demanda por esses produtos é também maior, em relação aos demais defensivos agrícolas.

Poucos são os trabalhos que estudam a possibilidade de se encontrar resíduos em tubérculos de batata. Rigitano (1982a) verificou que resíduos provenientes de aplicações tardias em plantas de tomate são os mais importantes, pela proximidade da colheita, bem como pelo fato de haver pequeno aumento de peso dos frutos nessa fase e, conseqüentemente, menor diluição dos resíduos. Desse modo, é necessário que produtos considerados de alta toxicidade para mamíferos, como o Granutox 5G, que gera um subproduto considerado carcinogênico, o phorate análogo oxigenado, durante a sua degradação, tenham seus resíduos monitorados em tubérculos de batata (Rigitano, 1982b).

A grande utilização desses produtos, o desconhecimento dos riscos associados ao seu uso, o conseqüente desrespeito às normas básicas de segurança, a livre comercialização e a pressão comercial por parte das empresas distribuidoras e produtoras constituem fatores críticos no agravamento dos problemas sociais encontrados no meio rural brasileiro, relacionados aos quadros de contaminação humana e ambiental. Acrescentam-se, ainda, à deficiência da assistência técnica ao homem do campo, a dificuldade de fiscalização da

inobservância das leis. E a atribuição da culpa aos trabalhadores, como contribuintes diretos do impacto sobre a saúde humana, decorrente da utilização de agrotóxicos, tornando-se um dos maiores problemas de saúde pública no meio rural, principalmente nos países em desenvolvimento.

Apesar de não haver, do ponto de vista de saúde pública, nenhuma situação de alarme com níveis altos de resíduos detectáveis nos principais produtos alimentares que compõem a cesta básica da população, o fato de não haver nenhum monitoramento sistematizado dos alimentos no país e o de alguns estudos pontuais mostrarem contaminações diversas indicam uma situação preocupante que exigiria uma ação técnica mais concreta.

Além dos resíduos encontrados nos alimentos, deve-se considerar também a possibilidade de contaminação ambiental. Pesticidas presentes no solo podem ser absorvidos pelas plantas, dissipados por degradação química ou microbiana, lixiviado ou volatilizado, bem como, uma parte do produto químico pode tornar-se parte do sistema solo na forma de resíduos ligados (El-Hamady et al., 2008). López-Pérez et al. (2006), investigando a presença de resíduos em batata, observaram que o Metalaxil foi o único pesticida detectado em tubérculos, cuja concentração não excedeu ao limite residual máximo, não tendo comprometido a segurança alimentar.

Algumas medidas têm sido recomendadas ao consumidor, para minimizar os riscos de contaminação dos alimentos, como fritar os alimentos, lavá-los e ou mantê-los sob condições de baixa temperatura. Isso pode ajudar quando não se conhece o teor de possíveis resíduos desses alimentos.

Soliman (2001) verificou uma redução nos níveis de pesticidas durante o processo de fritura, que variou de 30,1% e 35,3% com os compostos organoclorados, devido à sua alta estabilidade. Arcangelo et al. (2004) também verificaram que o cozimento diminuiu a presença de resíduos na amostra de batata contaminada.

Outro procedimento utilizado para remover resíduos de agrotóxicos presentes na superfície de alimentos é a lavagem com água por um período prolongado, pois o tempo de lavagem é um dos fatores que determinam a percentagem de remoção residual (Wolfé et al., 1959; Ritcey et al., 1987). Oliveira (1993), estudando a redução de resíduos de agrotóxicos em morangos, verificou que os resíduos de Captan, Mancozeb, Dicofol e Clorotalonil foram eliminados com a lavagem dos morangos com água. Em suma, a diminuição do teor de resíduo nos alimentos parece depender da natureza química dos defensivos aplicados.

3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGRIANUAL. **Anuário da agricultura brasileira**. São Paulo: FNP Consultoria, 2008. 502 p.
- ANDRADE, E. R.; FIGUEIRA, A. R. Degenerescência em seis cultivares de batata (*Solanum tuberosum* L.) na região Sul de Minas Gerais. **Ciência e Prática**, Lavras, v. 15, n. 1, p. 9-15, 1991.
- ANDRADE, E. R.; FIGUEIRA, A. R. Incidência e sintomatologia de estirpes do vírus Y(PVY) nas regiões produtoras de batata do Sul de Minas Gerais. **Ciência e Prática**, Lavras, v. 16, n. 3, p. 371-376, 1992.
- ARCANGELO, R. C.; COUTO, S. R. M.; FARIA, M. V. C.; ALVES, M. F. M.; MOURA, C. M.; LANZILLOTTI, H. S. Efeito da lavagem e cocção em batatas contaminadas por pesticidas organofosforados e carbamatos. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 18, n. 125, p. 12-16, 2004.
- ASSOCIAÇÃO NACIONAL DE DEFESA VEGETAL. **Utilização dos defensivos agrícolas no Brasil**. Disponível em: <http://www.andef.com.br/util_defensivos/>. Acesso em: 10 abr. 2008.
- ÁVILA, A. C.; MELO, P. E.; LEITE, L. R. O vírus Y da batata (*Potato virus Y*) e a batata-semente nacional: quem vencerá? **Batata Show**, Itapetininga, v. 7, n. 17, p. 14-17, 2007.
- BECZNER, L.; HORVÁTH, J.; ROMHÁNYI, I.; FÖRSTER, H. Studies on the etiology of tuber necrotic ringspot disease in potato. **Potato Research**, Netherlands, v. 27, n. 3, p. 339-352, 1984.
- BEEMSTER, A. B. R.; DE BOKX, J. A. Survey of properties and symptoms. In: DE BOKX, J. A.; WANT, J. P. H. van der. (Ed.). **Viruses of potato and seed potato production**. 2. ed. Wageningen: PUDOC, 1987. p. 84-113.
- BLANCO-URGOITI, B.; TRIBODET, M.; LECLERE, S.; PONZ, F.; PÉREZ DE SAN ROMÁN, C.; LEGORBURU, F. J.; KERLAN, C. Characterization of potato potyvirus Y (PVY) isolates from seed potato batches. Situation of the NTN, Wilga and Z isolates. **European Journal of Plant Pathology**, Netherlands, v. 104, n. 8, p. 811-819, 1998.

- BOITEAU, G.; SINGH, R. P. Field assessment of imidacloprid to reduce the spread of PVY^O and PLRV in potato. **American Journal Potato Research**, New York, v. 76, n. 1, p. 31-36, 1999.
- BOONHAM, N.; WALSH, K.; PRESTON, S.; NORTH, J.; SMITH, P.; BARKER, I. The detection of tuber necrotic isolates of *Potato virus Y*, and the accurate discrimination of PVY^O, PVY^N, and PVY^C strains using RT-PCR. **Journal of Virological Methods**, Amsterdam, v. 102, n. 1, p. 103-112, 2002.
- BRIOSO, P. S. T.; SOUZA-DIAS, J. A. C.; COSTA, A. S.; OLIVEIRA, D. E. Detecção de vírus da batata em plantas infectadas e em afídeos virulíferos através dos testes de “Polymerase Chain Reaction” e de “Dot-Blot”. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 21, n. 3, p. 328-335, 1996.
- CALDAS, E. D.; MIRANDA, M. C. C.; CONCEIÇÃO, M. H.; SOUZA, L. C. K. R. Dithiocarbamates residues in Brazilian food and the potential risk for consumers. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 42 n. 11, p. 1877-1883, 2004.
- CÂMARA, F. L. A.; CURPETINO, F. P.; FILGUEIRA, F. A. R. Redução na produtividade de cultivares de batata causada por vírus. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 4, n. 2, p. 8-10, 1986.
- CAMARGOS, V. N.; FIGUEIRA, A. R.; PEREIRA, S. L.; MOREIRA, C. N.; RAMALHO, T. O. Caracterização biológica de isolados de *Potato virus Y* (PVY) que induzem necrose superficial em tubérculos de batata. In: ENCONTRO NACIONAL DE PRODUÇÃO E ABASTECIMENTO DA BATATA, 13., 2007, Holambra, SP. **Resumos...** Holambra: ABBA, 2007. Disponível em: <http://www.abbabatatabrasileira.com.br/images/eventos/arquivos/resumo_39.pdf>. Acesso em: 10 dez. 2007.
- CHRZANOWSKA, M. New isolates of the necrotic strain of *Potato virus Y* (PVY^N) found recently in Poland. **Potato Research**, Wageningen, v. 34, n. 2, p. 179-182, 1991.
- CHRZANOWSKA, M. Differentiation of *Potato virus Y* (PVY) isolates. **Phytopathologia Polonica**, Poznán, v. 8, n. 20, p. 15-20, 1994.
- COSTA, A. S. Moléstias de vírus da batata. **Boletim do Campo**, Rio de Janeiro, v. 21, n. 190, p. 68-83, 1965.

COSTA, A. S.; CARVALHO, A. M. B.; KITAJIMA, E. W. Risca do tomateiro em São Paulo causada por estirpe do vírus Y. **Bragantia**, Campinas, v. 19, n. 67, p. 1111-1128, 1960.

COSTA, C. L. Vetores de vírus de plantas -1. Insetos. In: LUZ, Q. C. (Ed.). **Revisão anual de patologia de plantas**. Passo Fundo: [s.n.], 1998. v. 6, p. 103-171.

COSTA, C. L.; ALVES, A.; NAGAI, H.; COSTA, A. S. Controle de vira-cabeça do tomateiro pela destruição do vector II- comparação entre Granutox-5 e pulverizações foliares com modernos inseticidas. **Bragantia**, Campinas, v. 23, n. 22, p. 281-289, 1964.

CUPERTINO, F. P.; COSTA, A. S. Avaliação das perdas causadas por vírus na produção da batata I- vírus do enrolamento da folha. **Bragantia**, Campinas, v. 29, n. 31, p. 337-345, 1970.

DANIELS, J. Viroses da batata e suas implicações na produção de batata-semente no Rio Grande do Sul. **Summa Phytopatologica**, Piracicaba, v. 21, n. 3/4, p. 269-270, 1995.

DANIELS, J. Identificação sorológica de estirpes do vírus Y da batata no Sul do Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 25, n. 3, p. 565, 2000. Nota fitopatológica.

DANIELS, J.; PEREIRA, A. S. Resistência de genótipos de batata ao vírus do enrolamento da folha da batata (PLRV) e ao vírus Y (PVY). **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 22, n. 3, p. 521-524, 2004.

DE BOKX, J. A.; HUTTINGA, H. **Potato virus Y**. Kew: Commonwealth Mycological Institute/Association of Applied Biologists, 1981. 6 p. (Descriptions of plant viruses, 242).

DELGADO-SANCHEZ, S.; GROGAN, R. G. **Potato virus Y**. Kew: Commonwealth Mycological Institute/Association of Applied Biologists, 1970. 4 p. (Descriptions of plant viruses, 37).

EL-HAMADY, S. E.; KUBIAK, R.; DERBALAH, A. S. Fate of imidacloprid in soil and plant after application to cotton seeds. **Chemosphere**, London, v. 71, n. 11, p. 2173-2179, 2008.

FARIA, R. R.; GUIMARÃES, T. G.; JULIATTI, F. C.; TAKATSU, A. Eficácia de oxicleto de cobre, cloridrato de kasugamycin e diferentes doses de cloreto de benzalcônio no controle da podridão mole em tubérculos de batata causada por *Erwinia carotovora*. In: ENCONTRO NACIONAL DE PRODUÇÃO E ABASTECIMENTO DE BATATA, 11., 2001, Uberlândia, MG. **Resumos...** Uberlândia, MG: ABBA, 2001. p. 111-116.

FIGUEIRA, A. R. Viroses da batata e suas implicações na produção de batata-mente do estado de Minas Gerais: histórico do problema e soluções. **Summa Phytopatologica**, Piracicaba, v. 21, n. 3/4, p. 268-269, 1995.

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

FIGUEIRA, A. R.; MORAES, F. R. H.; PINTO, A. C. S. New PVY necrotic strain is causing great losses in Brazil: abstracts of presentation - 1996 APS Meeting. Indianapolis: APS, 1996a. Abstract, p. 85.

FIGUEIRA, A. R.; PINTO, A. C. S. Estirpe necrótica do vírus Y da batata em sementes importadas está causando problemas ao bataticultor mineiro. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, 28., 1995, Ilhéus, BA. **Anais...** Ilhéus, BA: SBF, 1995. p. 299.

FIGUEIRA, A. R.; PINTO, A. C. S.; MORAES, F. H. R. Alta incidência da nova estirpe necrótica do vírus Y da batata está ocorrendo em todos os estados produtores do Brasil. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, 29., 1996, Campo Grande, MS. **Anais...** Campo Grande: SBF, 1996b. p. 432.

FONSECA, L. N. **Estudo da diversidade de *Potato virus Y* (PVY) em batata (*Solanum tuberosum* L.), no Brasil**. 2003. 72 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Genômicas e Biotecnologia) - Universidade Católica de Brasília, Brasília, DF.

FONSECA, L. N.; INOUE-NAGATA, A. K.; NAGATA, T.; SINGH, R. P.; ÁVILA, A. C. Diferenciação de estirpes de *Potato virus Y* (PVY) por RT-PCR. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 23, n. 4, p. 904-910, 2005.

FONTES, P. C. R. Cultura da batata. In: _____. **Olericultura**: teoria e prática. Viçosa: UFV, 2005. p. 323-343.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION. **Estatísticas agrícolas**. Disponível em: <<http://www.fao.org/>>. Acesso em: 7 maio 2007.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION. **Estatísticas agrícolas**. Disponível em: <<http://www.fao.org/>>. Acesso em: 20 jun. 2008.

GLAIS, L.; TRIBODET, M.; KERLAN, C. Genomic variability in *Potato potyvirus Y* (PVY): evidence that PVY^N W and PVY^{NTN} variants are single to multiple recombinants between PVY^O and PVY^N isolates. **Archives of Virology**, v. 147, n. 2, p. 363-378, 2002.

GLAIS, L.; TRIBODET, M.; KERLAN, C. Specific detection of the PVY^N-W variant of *Potato virus Y*. **Journal of Virological Methods**, Amsterdam, v. 125, n. 2, p. 131-136, 2005.

HIRANO, E. Histórico e situação atual do índice de infecção de viroses nos lotes de batata-semente em Santa Catarina. **Summa Phytopatologica**, Piracicaba, v. 21, n. 3/4, p. 271, 1995.

HOOKE, W. J. **Compendium of potato diseases**. Saint Paul: American Phytopathological Society, 1981. 125 p.

KERLAN, C. *Potato virus Y*. 2006. (Descriptions of plant viruses, 414). Disponível em: <<http://www.dpvweb.net/dpv/showdpv.php?dpvno=414>>. Acesso em: 25 fev. 2008.

KERLAN, C.; TRIBODET, M.; GLAIS, L.; GUILLET, M. Variability of *Potato virus Y* in potato crops in France. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 147, n. 11/12, p. 643-651, 1999.

LE ROMANCER, M.; KERLAN, C.; NEDELLEC, M. Biological characterisation of various geographical isolates of *Potato virus Y* inducing superficial necrosis on potato tubers. **Plant Pathology**, Oxford, v. 43, n. 1, p. 138-144, 1994.

LIMA, M. L. R. Z. C. Viroses da batata e suas implicações na produção da batata-semente no estado do Paraná: histórico do problema e soluções. **Summa Phytopatologica**, Piracicaba, v. 21, n. 3/4, p. 272-273, 1995.

LIMA, M. L. R. Z. C.; HAMERSCHMIDT, I. Avaliação da sanidade de tubérculos semente de batata utilizados em plantios de batata-consumo em dois municípios do estado do Paraná. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, 15., 1982, São Paulo, SP. **Anais...** São Paulo: SBF, 1982. p. 549.

LÓPEZ-PÉREZ, G. C.; ARIAS-ESTÉVEZ, M.; LÓPEZ-PERIAGO, E.; SOTO-GONZÁLEZ, B.; CANCHO-GRANDE, B.; SIMAL-GÁNDARA, J. Dynamics of pesticides in potato crops. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 54, n. 5, p. 1797-1803, 2006.

MARTON, L.; BUSO, J. A.; DUSI, A. N.; MELO, P. E. Degenerescência devido a viroses em cultivares de batata. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE OLERICULTURA, 23., 1993, Brasília, DF. **Resumos...** Brasília, DF: SOB, 1993. p. 82.

MASCARENHAS, M. H. T.; RESENDE, L. M. A.; RUFINO, J. L. S.; PAIVA, B. M.; MESQUITA, H. A.; GUIMARÃES, T. G.; RIBEIRO, J. D. R.; PAIVA, H. F.; PAIVA, E. V. B.; CARVALHO, V. M.; DINIZ, R. S.; CORREIA, L. G. **Cadeia produtiva da batata no estado de Minas Gerais: cadeias produtivas.** Belo Horizonte: Epamig, 1999. 44 p.

MCDONALD, J. G.; SINGH, R. P. Host range, symptomology, and serology of isolates of *Potato virus Y* (PVY) that share properties with both the PVY^N and PVY^O strain groups. **American Potato Journal**, Orono, v. 73, n. 7, p. 309-315, 1996a

MCDONALD, J. G.; SINGH, R. P. Response of potato cultivars to North American isolates of PVY^{NTN}. **American Potato Journal**, Orono, v. 73, p. 317-323, 1996b.

MESQUITA, H. A.; PAULA, M. B.; ALVARENGA, M. I. N.; REGINA, S. M. A cultura da batata e preservação ambiental. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 20, n. 197, p. 20-23, 1999.

MORAES, F. H. R.; FIGUEIRA, A. R.; SANTOS, R. C. Caracterização da nova estirpe necrótica do vírus Y da batata. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, 30., 1997, Poços de Caldas, MG. **Anais...** Poços de Caldas: SBF, 1997. p. 339.

MORAES, F. H. R.; FIGUEIRA, A. R.; SANTOS, R. C. Estudo comparativo de algumas propriedades de cinco isolados do vírus Y da batata. **Summa Phytopathologica**, Jaboticabal, v. 25, n. 2, p. 117-125, 1999.

MURPHY, F. A.; FAUQUET, C. M.; BISHOP, D. H. L.; GHABRIAL, S. A.; JARVIS, A. W.; MARTELLI, G. P.; MAYO, M. A.; SUMMERS, M. D. Virus taxonomy classification and nomenclature of viruses. In: REPORT OF THE INTERNATIONAL COMMITTEE ON TAXONOMY OF VIRUSES, 6, 1995, New York. **Proceedings...** New York, 1995. p. 348-358.

OHSHIMA, K.; SAKO, K.; HIRAISHI, C.; NAKAGAWA, A.; MATSUO, K.; OGAWA, T.; SHIKATA, E.; SAKO, N. Potato tuber necrotic ringspot disease occurring in Japan: its association with *Potato virus Y* necrotic strain. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 84, n. 10 p. 1109-1115, 2000.

OLIVEIRA, J. J. V. **Resíduos de agrotóxicos em morangos e sua redução por lavagem com água e estocagem em geladeira (5° C)**. 1993. 130 f. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP.

PALAZZO, S. R. L. **Identificação do PVY^O-1 em lavouras comerciais de tomateiros e reação de acessos de *Lycopersicon* spp.** 2005. 81 p. Dissertação (Mestrado em Agricultura Tropical e Subtropical) – Instituto Agrônomo de Campinas, Campinas, SP.

PEREIRA, E. M. S.; LUZ, J. M. Q.; MOURA, C. C. **A batata e seus benefícios nutricionais**. Uberlândia, MG: EDUFU, 2005. v. 1, 58 p.

PIRON, P. G. M. New aphid vectors of *Potato virus Y^N*. **Netherlands Journal of Plant Pathology**, Wageningen, v. 92, n. 5, p. 223-229, 1986.

RIGITANO, R. L. O. Persistência de resíduos de methyl parathion e quinalphos em frutos de tomate (*Lycopersicon esculentum*). **Ciência e Prática**, Lavras, v. 6, n. 1, p. 63-70, 1982a.

RIGITANO, R. L. O. Resíduos de phorate e seus principais metabólitos em tubérculos de batatinha (*Solanum tuberosum* L.). **Ciência e Prática**, Lavras, v. 6, n. 2, p. 151-158, 1982b.

RITCEY, G.; FRANK, R.; McEWEN, F. L.; BRAUN, H. E. Captan residues on strawberries and estimates of exposure to pickers. **Bulletin of Environmental Contamination & Toxicology**, Nova Iorque, v. 35, n. 5, p. 840-846, 1987.

- SALAS, F. J. S. **Comportamento de *Myzus persicae* (SULZER) (HEMIPTERA: APHIDIDAE) e transmissão de estirpes de *Potato virus Y* em diferentes cultivares de batata.** 2004. 122p. Tese (Doutorado em Entomologia Agrícola) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, SP.
- SHUKLA, D. D.; WARD, C. W.; BRUNT, A. A. **The *Potyviridae*.** Wallingford: CAB International Wallingford, 1994. 516 p.
- SIGVALD, R. The relative efficiency of some aphid species as vectors of *Potato virus Y^O* (PVY^O). **Potato Research**, Netherlands, v. 27, n. 3, p. 285-290, 1984.
- SINGH, R. P.; SINGH, M. Specific detection of *Potato virus A* in dormant tubers by reverse transcription polymerase chain reaction. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 82, n. 2, p. 230-234, 1998.
- SOLIMAN, K. M. Changes in concentration of pesticide residues in potatoes during washing and home preparation. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 39, n. 8, p. 887-891, 2001.
- SOUZA-DIAS, J. A. C. Viroses da batata e suas implicações na produção de batata-semente no estado de São Paulo. **Summa Phytopathologica**, Piracicaba, v. 21, n. 3/4, p. 264-266, 1995.
- SOUZA-DIAS, J. A. C. Doenças causadas por vírus em batata. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 18, n. 184, p. 54-63, 1996.
- SOUZA-DIAS, J. A. C. Raças do vírus Y da batata (PVY) e a questão da variante NTN. **Batata Show**, Itapetininga, v. 1, n. 2, p. 16-21, 2001.
- SOUZA-DIAS, J. A. C.; AMANCIO, A. V.; COSTA, A. S. O vírus do enrolamento da folha da batata continua a ser a principal causa de degenerescência da batata-semente no estado de São Paulo. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 15, n. 2, p. 136, jul. 1990.
- SOUZA-DIAS, J. A. C.; BARROSO, P. A. V.; SILVA FILHO, H. M.; HAYASHI, P. C.; FO, A. P. O. Ocorrência de potyvirus associado a anéis necróticos superficiais em tubérculos de batata 'Atlantic': PVY^{NTN} no Brasil. In: CONGRESSO PAULISTA DE FITOPATOLOGIA, 21., 1998, Botucatu, SP. **Anais...** Botucatu, SP: SPF, 1998. p. 74.

SOUZA-DIAS, J. A. C.; COSTA, A. S.; NARDIN, A. M. Potato leafroll virus in solanaceous weeds in Brazil explains severe outbreaks of the disease in absence of known potato donor sources. **Summa Phytopathologica**, Piracicaba, v. 19, n. 2, p. 80-85, 1993.

SOUZA-DIAS, J. A. C.; COSTA, A. S.; RAMOS, V. J. Enrolamento-da-folha é também praticamente o único fator de degenerescência da batata-semente no período 1980-84 na Est. Experimental de Itararé-SP. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 9, n. 2, p. 405, 1984.

SOUZA-DIAS, J. A. C.; SILVA FILHO, H. M.; GRANJA, N. P.; HAYASHI, P. C. Novas observações sobre a putativa raça NTN do vírus Y da batata (PVY^{NTN}), causadora de anéis necróticos superficiais nos tubérculos. In: CONGRESSO PAULISTA DE FITOPATOLOGIA, 22., 1999, Jaboticabal, SP. **Anais...** Jaboticabal, SP: SPF: 1999. p. 36.

SOUZA-DIAS, J. A. C.; TRISTÃO, F. J. Rise of PVY incidence in seed potato regions of São Paulo State (Brazil) associated with the introduction of Atlantic potatoes. In: ANNUAL MEETING OF THE POTATO ASSOCIATION OF AMEIRCA, 81., 1997, Charlottetown, Prince Edw Is. **American Potato Journal**, Orono, v. 74, p. 469, 1997.

SOUZA-DIAS, J. A. C.; TRISTÃO, J. F.; MIRANDA, H. S. Vírus Y da batata-semente cv. Atlantic: alteração na epidemiologia da virose em São Paulo e Paraná. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 20, p. 320, 1995.

TRUTRA, A. A. C.; SOUZA, A. R. R.; NASCIMENTO, A. V. S.; PEREIRA, R. C.; PINTO, C. M. F.; BROMMONSCHENKEL, S. H.; CARVALHO, M. G.; ZERBINI, F. M. Identidade e propriedades de isolados de potyvírus provenientes de *Capsicum* spp. **Fitopatologia Brasileira**, Fortaleza, v. 29, n. 2, p. 160-168, 2004.

URCUQUI-INCHIMA, S.; HAENNI, A. L.; BERNARDI, F. Potyvirus proteins: a wealth of functions. **Virus Research**, Paris, v. 74, n. 1/2, p. 157-175, 2001.

WANG, S. Estudo comparativo de vários métodos de extração e purificação de resíduo de BHC em manteiga comercial. **Ciência e Prática**, Lavras, v. 6, n. 1, p. 71-78, 1982.

WEIDEMANN, H. L. Importance and control of *Potato virus Y^N* (PVY^N) in seed potato production. **Potato Research**, Wageningen, v. 31, n. 1, p. 85-94, 1988.

WOLFE, H. R.; ELLIOTT, J. W.; DUKHAM, W. F. The trend of DDT and parathion residues on apples grown in central Washington. **Journal of Economic Entomology**, Califórnia, v. 52, n. 6, p. 1053-1057, 1959.

YOSHIDA, H. As vantagens do inseticida sistêmico granulado aplicado no solo. **Boletim do Campo**, Rio de Janeiro, v. 29, n. 256, p. 9-12, 1973.

ZERBINI, F. M.; MACIEL-ZAMBOLIM, E. A família *Potyviridae* - parte II. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v. 8, p. 225-265, 2000.

CAPÍTULO 2: Caracterização de isolados de *Potato virus Y* (PVY) das principais regiões produtoras de batata de Minas Gerais

RESUMO

O *Potato virus Y* (PVY) se tornou um dos vírus de maior importância no Brasil, em função das perdas ocasionadas e do grande número de lotes de batata condenados pela alta incidência ocorrida nos últimos anos. Este trabalho foi realizado com o objetivo de verificar quais isolados desse vírus estão ocorrendo em condições de campo em Minas Gerais. Catorze amostras de tubérculos e ou folhas de batata, com suspeita de infecção, foram coletadas em campos de produção de batata ou fornecidas pelo Centro de Indexação de Vírus de Minas Gerais. Após diagnose sorológica, os isolados virais coletados foram inoculados mecanicamente em plantas de fumo (*Nicotiana tabacum* L.) cv. Turkish NN, para a observação dos sintomas e a multiplicação e armazenamento do inóculo e, em outras plantas hospedeiras, para o estudo da sua reação. Posteriormente, foi feita a identificação das estirpes, por meio de *primers* específicos e um fragmento de 849 pb, contendo a região da proteína do capsídeo, foi amplificado, seqüenciado e analisado. Entre as plantas inoculadas com os catorze isolados, *Gomphrena globosa*, *Datura stramonium*, *Chenopodium quinoa* e *Nicandra physaloides* foram imunes, enquanto as restantes reagiram com sintomas de diferentes severidades. Os resultados dos testes biológicos, de PCR e os do seqüenciamento indicaram que todos os isolados pertenciam à estirpe necrótica do PVY, sendo que metade deles pertencia à variante PVY^{NTN}. O alinhamento múltiplo de nucleotídeos mostrou que as identidades entre os 14 isolados variaram entre 87% e 99% quando comparados entre si e entre 86% e 99%, quando comparados com os isolados do GenBank. A identidade entre os isolados do GenBank apresentou uma variabilidade semelhante, entre 88% e 99%. Considerando-se o alinhamento múltiplo de aminoácidos, a identidade entre os isolados brasileiros ficou entre 83% e 98% e, entre eles e os do GenBank, foi de 86% a 99%. Quando os isolados do GenBank foram comparados entre si, observou-se identidade entre 91% e 100%. Tanto nas árvores filogenéticas construídas com base no alinhamento de nucleotídeos como no de aminoácidos, os isolados se distribuíram em dois grupos distintos, tendo os PVY^{NTN} (SGT-AG, TAP-AG, SAT-AG, IPU-MA, ALF-VI, ARA-MO e COR-AG) se reunido no primeiro e os isolados PVY^N (MFE-AG, BRE-EM, LUM-CE, FOR-AG, SGS-AG, LAV-CL e POL-AG), no segundo. No primeiro grupo, os isolados ALF-VI, ARA-MO e COR-AG, e no segundo, os isolados MFE-AG e BRE-EM e LUM-CE se separaram dos demais, mostrando maior distância genética. Nas árvores filogenéticas construídas com base nos nucleotídeos dos isolados brasileiros e de outros 24 isolados de PVY do GenBank, eles se separaram em dois grandes grupos, tendo o U25672 da China ficado separado de todos eles. O primeiro grupo foi constituído por dois subgrupos, contendo os isolados do tipo PVY^{NTN}, com exceção do isolado

AJ890345, da Alemanha, que se separou desse grupo e mostrou maior proximidade genética com os isolados da estirpe necrótica comum. Os isolados brasileiros do tipo NTN, ARA-MO e COR-AG formaram um subgrupo separado, enquanto os demais se distribuíram no segundo subgrupo. No grupo da estirpe necrótica, também subdividido em dois subgrupos distintos, o isolado brasileiro, MFE-AG, se separou dos demais, ficando sozinho no primeiro, enquanto os demais se distribuíram no segundo. Alguns isolados do GenBank descritos como membros da estirpe necrótica comum, como o EF027868 do Reino Unido e o EU182576 da China, se agruparam com os isolados NTN e apresentaram alta identidade com eles. Na árvore construída com base na seqüência de aminoácidos, o primeiro grupo foi constituído apenas pelos isolados AY601680 e U25672, da China e o AY840082, do Brasil. No segundo grupo, os isolados necróticos brasileiros BRE-EM e MFE-AG se separaram de todos os demais e os restantes se separaram em dois subgrupos com os necróticos em um e os NTN em outro. Novamente, os isolados ALF-VI, ARA-MO e COR-AG apresentaram um maior distanciamento genético dos demais isolados NTN. O fato de o PVY^{NTN} ter sido detectado em metade dos campos amostrados em Minas Gerais indica que esse deve estar encontrando as condições favoráveis para se disseminar nos campos brasileiros, adquirindo uma importância crescente com o tempo. Considerando-se que esses isolados NTN, além de afetar a quantidade, afetam decisivamente a qualidade dos tubérculos, causando anéis necróticos que inviabilizam a sua comercialização, isso significa um problema adicional para o bataticultor brasileiro.

ABSTRACT

Potato virus Y (PVY) became one of the most important virus in Brazilian potato crops because of the occurred losses and also the great number of rejected potato seed lots due to its high incidence in the last years. The objective of this work was to verify which PVY strains are infecting plants in potato fields located in the potato producers regions of Minas Gerais State-Brazil. Fourteen samples of tubers and/or leaves of infected potato plants were either collected in potato-growing fields or donated by the Center of Virus Indexation from Minas Gerais. After serological diagnosis, they were mechanically inoculated on tobacco plants (*Nicotiana tabacum* L.) cv. Turkish NN, for symptoms survey and virus multiplication and storage, and also in other plant hosts for the study of its reactions. Afterwards, the identification of the PVY strains was done using specific primers, and a fragment of 849 pb containing the capsid protein region was amplified, sequenced and analyzed. Among the inoculated plants, *Gomphrena globosa*, *Datura stramonium*, *Chenopodium quinoa*, and *Nicandra physaloides* were immune, while the remainders reacted with symptoms of different severities, depending on the PVY isolate. The results of the mechanical inoculation and PCR, further confirmed by capsid protein sequencing pointed out that all the fourteen Brazilian PVY isolates were necrotic strain of PVY. However, half of them were PVY^{NTN} variant. The multiple alignment of nucleotides showed that the identities among the 14 isolates ranged between 87 and 99% when compared to each other, and from 86% to 99% when compared to the GenBank PVY isolates. The identity among the GenBank PVY presented similar values, between 88% and 99%. Considering the multiple alignments of amino acids, the identity among the Brazilian isolates varied between 83% and 98% and among those and the GenBank PVY isolates ranged from 86% to 99%. The identity values among the GenBank isolates were from 91% to 100%. Either in the phylogenetic trees based on the nucleotide or based on amino acid alignment of Brazilian isolates, they were divided into two distinct groups, with the PVY^{NTN} (SGT-AG, TAP-AG, SAT-AG, IPU-MA, ALF-VI, ARA-MO and COR-AG) in the first and the PVY^N (MFE-AG, BRE-EM, LUM-CE, FOR-AG, SGS-AG, LAV-CL e POL-AG) in the second one. In the phylogenetic trees based on the nucleotides of Brazilian isolates and also on the other 24 GenBank PVY isolates, they were separated in two great groups, but the U25672 isolate from China stood alone and isolated from all of them. The first group was divided in two subgroups, containing the PVY^{NTN} isolates, except the AJ890345 from Germany, which was closer to PVY^N isolates. The PVY^{NTN} Brazilian isolates, ARA-MO and COR-AG joined the first subgroup and the remaining were displaced in the second one. Within the group of PVY^N, only MFE-AG

isolate stood separate and the other thirteen Brazilian isolates joined the other similar PVY isolates from GenBank. Some PVY isolates from GenBank, described as PVY^N, such as EF027868, from United Kingdom, and EU182576 from China, grouped together with PVY^{NTN} isolates, and presented a high identity with them. In the phylogenetic tree based on amino acids, the first group was composed only by three isolates, the AY601680 and U25672 from China and AY840082 from Brazil. In the second group, BRE-EM and MFE-AG separated themselves from all the remaining and stood both alone and the remaining PVY isolates were divided in PNY^N and PVY^{NTN} subgroups. The AF-VI, ARA-MO and COR-AG presented again a greater genetic distance from the other similar PVY isolates. That great PVY^{NTN} occurrence in Minas Gerais State suggests that this genetic variant probably found good spread conditions at this state fields, increasing its importance with time. Considering that the PVY^{NTN} isolates, besides decreasing the potato yields, also affect the quality of the tubers, causing necrotic rings and making them improper for being commercialized, it constitutes an additional problem to the Brazilian potato growers.

1 INTRODUÇÃO

A batata (*Solanum tuberosum* L.), originária dos Andes, na América do Sul, foi levada para a Europa e introduzida em países, como Espanha e Inglaterra, em 1570 e 1588, respectivamente (Melo, 2007). Da Europa, foi levada para a América do Norte, a África do Sul e a Austrália, no início do século XVIII, só chegando ao Brasil no fim do século XIX (Fedalto, 1982; Hawkes, 1994; Melo, 2007), e é considerada, desde a Antiguidade, como um alimento de alto valor nutricional. No Brasil, a produtividade média da batata, em 2007, foi de 23,9 t/ha, superando o ano anterior, com 22,3 t/ha. Minas Gerais é o maior produtor nacional de batata, seguido por São Paulo, Paraná, Rio Grande do Sul, Bahia e Goiás (Agrianual, 2008).

A cultura da batata é muito suscetível ao ataque de pragas e doenças e, dentre essas, as de etiologia viral têm merecido destaque, por não apresentarem medidas de controle curativas e pelo fato de essa planta ser propagada vegetativamente, perpetuando o vírus de uma para outra geração e entrando em degenerescência após poucas re-multiplicações no campo (Costa, 1965; Cupertino & Costa, 1970; Hooker, 1981; Beemster & De Bokx, 1987; Weidemann, 1988).

Diversos vírus podem infectar a batateira, entretanto, o *Potato virus Y* (PVY) tem sido o mais prevalente nos campos brasileiros de batata, na última década (Figueira & Pinto, 1995; Souza-Dias et al., 1995; Figueira et al., 1996a,b; Moraes et al., 1997; Souza-Dias & Tristão, 1997). Trata-se do membro tipo do gênero *Potyvirus*, família *Potyviridae*, e foi descrito pela primeira vez, na Inglaterra, por Smith (1931), citado por De Bokx & Huttinga (1981), Shukla (1994) e Kerlan (2006). No Brasil, provavelmente está presente desde que se iniciou o cultivo da batata (Silberschmidt, 1937; Kramer & Silberschmidt, 1940;

Costa & Forster, 1942). Causador do mosaico comum da batateira, o PVY é considerado importante para a cultura da batata porque pode reduzir significativamente a produção da maioria das cultivares plantadas no mundo todo, dependendo da cultivar, da época de infecção e da estirpe do vírus (De Bokx & Huttinga, 1981; Lima & Hammerschmidt, 1982; Câmara et al., 1986; Marton et al., 1993; Figueira et al., 1996b).

O PVY possui um ssRNA⁺ com cerca de 9,7 Kb de tamanho e é encapsulado em partícula filamentosa, flexível, medindo em torno de 730nm de comprimento e, aproximadamente, 11nm de diâmetro, com um orifício central em torno de 2-3nm de diâmetro (De Bokx & Huttinga, 1981; Shukla, 1994; Figueira, 1999; Kerlan, 2006). Considerando os sintomas induzidos em plantas de fumo, esse vírus têm sido classificados em três grupos de estirpes: a primeira é a comum (PVY^O), que causa mosaico leve em plantas de fumo e, dependendo da cultivar de batata, pode induzir necrose, amarelecimento e morte prematura. Essa estirpe causa necrose sistêmica em plantas jovens de *Physalis floridana* e é de distribuição mundial (De Bokx & Huttinga, 1981; Hooker, 1981). A estirpe necrótica (PVY^N) foi assim denominada por causar necrose em plantas de fumo e está disseminada na Europa, em partes da África e na América do Sul (De Bokx & Huttinga, 1981; Hooker, 1981).

Os isolados dessa estirpe são bastante variáveis, como o causador de anéis necróticos em tubérculos de batata denominado de PVY^{NTN}. Além disso, se diferenciam dos demais isolados da estirpe necrótica pela sua capacidade de infectar algumas cultivares de pimentão (Le Romancer et al., 1994). O isolado PVY^{NTN} se originou da recombinação das estirpes comum e necrótica e vem quebrando a resistência de cultivares comerciais, como é o caso da cv. Monalisa (Souza-Dias, 2001; Glais et al., 2002; Fonseca, 2003). Outra variante da estirpe necrótica é o Wilga (PVY^{N-Wi}), que foi descrito, pela primeira vez, na Polônia, na cultivar de batata que originou seu nome. Assim como a variante NTN, o

Wilga induz necrose em plantas de fumo, porém, bem mais leve do que o usual, não reage sorologicamente com anti-soro monoclonal para essa estirpe necrótica e se destaca, principalmente, por apresentar alto poder de disseminação no campo (Beczner et al., 1984; Chrzanowska, 1991, 1994; Le Romancer et al., 1994; Blanco-Urgoiti et al., 1998; Nie & Singh, 2003). Já a estirpe PVY^C (estirpe clorótica) induz sintomas do tipo “stipple streak”, em algumas cultivares de batata que possuem o gene *Nc* (De Bokx & Huttinga, 1981; Singh et al., 2008). Essa estirpe já foi relatada na Austrália, Índia e parte da Europa (De Bokx & Huttinga, 1981). Para identificação, caracterização e classificação de isolados de PVY, podem ser empregadas diversas técnicas.

A caracterização das estirpes por métodos biológicos ainda hoje é muito usada, principalmente quando não se dispõem de informações sobre o vírus em estudo, sendo, nesse caso, uma ferramenta de auxílio na identificação do patógeno. Nesses métodos utilizam-se, com frequência, os ensaios com plantas indicadoras e transmissão com vetores virais. Apesar de serem considerados mais simples, são também mais demorados e, muitas vezes, os resultados são imprecisos.

Quanto à caracterização sorológica, apesar de ser fácil e largamente utilizada para a diagnose de vírus, a discriminação entre as estirpes, e principalmente os variantes genéticos do PVY, só pode ser feita por meio de testes moleculares, como RT-PCR, frequentemente seguidos pelo seqüenciamento dos nucleotídeos (Glais et al., 1996; Weidemann & Maiss 1996; Fonseca, 2003; Fonseca et al., 2005).

Para fazer a caracterização dos isolados de PVY que ocorrem em Minas Gerais, neste trabalho foram coletados catorze isolados desse vírus, provenientes das principais regiões produtoras. Esses isolados foram inicialmente diagnosticados por DAS-ELISA, empregando anticorpos policlonais e, em seguida, foram inoculados mecanicamente em diferentes plantas indicadoras

para investigação dos sintomas induzidos. Em seguida, as estirpes e as variantes foram discriminadas por RT-PCR empregando *primers* específicos e a sua capa protéica foi amplificada, seqüenciada e analisada para investigar a sua filogenia.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Localização do experimento

Os experimentos foram conduzidos em casa de vegetação, no Laboratório de Fitovirologia Molecular e no Centro de Indexação de Vírus de Minas Gerais (CIV-MG), do Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Lavras (UFLA).

2.2 Origem, obtenção e armazenamento dos isolados de PVY

Os isolados eram provenientes de tubérculos e ou folhas de batatas em campos de produção de batata consumo e de batata-semente infectadas encaminhadas ao Centro de Indexação de Vírus de Minas Gerais para análise. Foram, inicialmente, diagnosticados quanto à presença de PVY por DAS-ELISA, empregando-se anti-soro policlonal da Bioreba. Quando na forma de tubérculos, esses foram plantados em casa de vegetação em vasos de 5 kg, utilizando-se como substrato: terra, areia e esterco previamente fumigados com brometo de metila, na proporção 2:1:1. O extrato foliar das plantas com sintomas, coletadas no campo ou oriundas dos tubérculos, foi inoculado em plantas de fumo cv. Turkish NN. Após o aparecimento dos sintomas, parte das folhas foi armazenada à temperatura de -80°C, para re-inoculação e multiplicação do vírus, sempre que necessário. A denominação e a origem dos isolados estão discriminadas na Tabela 1. Na denominação do isolado empregou-se a nomenclatura binomial, colocando-se as iniciais do local de origem do isolado, acrescidas das iniciais da cultivar.

2.3 Diagnose sorológica e molecular do PVY em batata

A coleta das amostras foi feita nas principais regiões produtoras do estado, com ênfase nos municípios representativos de cada região. As regiões

amostradas foram Campos das Vertentes, Sul, Triângulo Mineiro e Alto do Paranaíba, por serem as maiores produtoras (Tabela 1; Figura 1).

TABELA 1 Isolados de *Potato virus Y*: procedência, região, cultivar de batata infectada e denominação dos isolados estudados. Lavras, MG, 2008.

PROCEDÊNCIA	REGIÃO*	CULTIVAR	DENOMINAÇÃO
SACRAMENTO	TM	ÁGATA	SAT-AG
SÃO GONÇALO DO SAPUCAÍ	SM	ÁGATA	SGS-AG
LUMINÁRIAS	CV	CAESAR	LUM-CE
MARIA DA FÉ	SM	ÁGATA	MFE-AG
FORMIGA	SM	ÁGATA	FOR-AG
COROMANDEL	AP	ÁGATA	COR-AG
PRES. OLEGÁRIO	AP	ÁGATA	POL-AG
LAVRAS	CV	CLONE	LAV-CL
SÃO GOTARDO	AP	ÁGATA	SGO-AG
ALFENAS	SM	VIVALDI	ALF-VI
IPUIÚNA	SM	MARKIES	IPU-MA
TAPIRA	TM	ÁGATA	TAP-AG
ARAXÁ	TM	MONALISA	ARA-MO
BOM REPOUSO	SM	EMERAUDE	BRE-EM

*TM – Triângulo Mineiro; SM – Sul de Minas Gerais; CV – Campo das Vertentes; AP – Alto do Paranaíba.

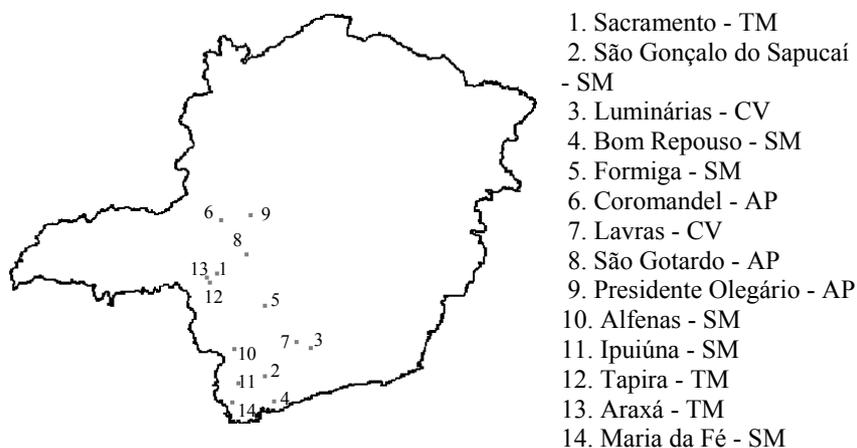


FIGURA 1 Mapa do estado de Minas Gerais com a indicação dos municípios e regiões os quais foram coletados os catorze isolados de *Potato virus Y* (PVY) estudados. Lavras, MG, 2008.

2.3.1 Teste DAS-ELISA

O teste DAS-ELISA (Clark & Adams, 1977) foi empregado para diagnosticar o PVY no material coletado no campo e para checar a presença do vírus nas plantas inoculadas mecanicamente com e sem sintomas. Além do PVY, foram realizados testes para verificar a presença dos vírus X (*Potato virus X* - PVX), vírus S (*Potato virus S* - PVS) e enrolamento da folha (*Potato leafroll virus* - PLRV), visando detectar possíveis casos de infecções mistas. Foram utilizados os anticorpos policlonais da Bioreba e o procedimento empregado foi o recomendado pelo fabricante.

2.3.2 Discriminação e identificação dos isolados de PVY por RT-PCR

Para a diferenciação das estirpes/variantes genéticas de PVY foi empregada a combinação de *primers* descrito por Boonham et al. (2002), discriminada na Tabela 2.

TABELA 2 Seqüência de *primers* empregados na caracterização de isolados de *Potato virus Y* (PVY) coletados em Minas Gerais. Lavras, MG, 2008.

<i>Primers</i>	Seqüência (5' - 3')	Amplificação (pb)
O-9295-R	TGTACTGATGCCACCGTCGAAC	
O-8687-F	TCTGGRACACATACWGTRCCRA	609
N-8687-F	TCTGGAACTCAYACTGTGCCAC	280

2.3.2.1 Extração do RNA total dos isolados de PVY

A extração do RNA seguiu o protocolo de Trizol (AFGC Protocols, 2002). Folhas de fumo jovens, com os sintomas característicos do PVY, foram maceradas em almofariz na presença de nitrogênio líquido e, ao pó obtido, foi adicionada a solução de Trizol (380 mL/L; 118,16g de guanidina tiocianato, 0,8M; 76,12g de amônia tiocianato, 0,4M; acetato de sódio 33,4 mL, 0,1M; glicerol 50 mL e água ultrapura), na proporção de 1 g/5mL. Posteriormente, os microtubos foram incubados em banho-maria, por 5 minutos, à temperatura constante de 60°C e centrifugados a 12.000 rpm, por 10 minutos, a 4°C. Descartou-se o precipitado, adicionaram-se 300µL de clorofórmio a cada microtubo, agitou-se em vórtex e deixou-se à temperatura ambiente por 3 minutos. Em seguida, os microtubos foram centrifugados a 12.000 rpm, por 10 minutos, a 4°C, a fase aquosa foi cuidadosamente transferida para outro microtubo, e a ela foi adicionado metade do seu volume de isopropanol e a outra metade com uma solução de 0,8M de citrato de sódio/1,2M de NaCl. Essa mistura foi homogeneizada cuidadosamente por inversão dos tubos e deixada à temperatura ambiente, por 10 minutos, para a precipitação do RNA. Posteriormente, os microtubos foram centrifugados a 12.000 rpm, por 10

minutos, a 4°C, o sobrenadante descartado e o precipitado lavado com 300 µL de etanol gelado a 70%. Após a secagem do precipitado, a vácuo, o RNA foi ressuspenso em 25µL de água ultrapura tratada com dietilpirocarbonato (DEPC). O RNA total extraído foi analisado em gel de agarose a 0,7%.

2.3.2.2 Síntese do cDNA

A reação para a síntese do cDNA foi preparada para um volume final de 20µL contendo: 2 µL do tampão 5 X M-MLV; 4 µL de MgCl₂ 25 mM; 2 µL de dNTPs 10mM; 5,5µL de água com DEPC (dietilpirocarbonato); 1 µL do *Primer* O-9295-R; 0,5µL da enzima transcriptase reversa(M-MLV RT) e 5 µL do RNA total extraído. Os tubos foram incubados e submetidos a 42°C, por 60 minutos, e 95°C, por 5 minutos, após o quê foram imediatamente colocados em um recipiente com gelo.

2.3.2.3 Reação de PCR

Na reação de PCR empregada para cada isolado, utilizaram-se: 12µL de água ultrapura previamente tratada com DEPC, 5,0 µL do tampão 5X PCR; 1,5 µL de MgCl₂ 25mM; 0,5 µL de dNTPs 10mM; 1,25 µL de cada um dos 3 *primers* em estudo (N-8687 F, O-8687 F e O-9295 R); 0,25 µL da enzima Taq DNA polimerase, 2 µL do cDNA, montando uma reação final de 25 µL . Na reação de amplificação do DNA foi empregado o seguinte ciclo: 94°C, por 2 minutos; 94°C, por 1 minuto; 65°C, por 1 minuto; 72°C, por 1 minuto; isso foi repetido por 30 vezes, em seguida foi utilizado um ciclo de 72°C, por 10 minutos e por fim permaneceu a 4°C indefinidamente. Os produtos amplificados foram, então, analisados em gel de agarose a 0,7%, corados com *GelRed Nucleid Acid Gel Stain* (Invitrogen).

2.4 Inoculação mecânica de isolados de PVY em diversas espécies de plantas

As plantas hospedeiras foram obtidas por semeadura em bandejas plásticas, com posterior transplante para vasos com capacidade de 2kg, contendo o substrato descrito anteriormente. As espécies testadas foram: *Chenopodium quinoa*; *C. amaranticolor*; *Nicotiana tabacum*, cv. TNN, cv. Sansun, cv. Havana e cv. White Burley; *Nicotiana Glutinosa*; *N. rustica*; *Capsicum annum* cv. Bastidon; *Physalis floridana*; *Datura stramonium*; *Gomphrena globosa* e *Nicandra physaloides*.

Plantas com três ou quatro folhas definidas foram inoculadas mecanicamente utilizando-se extrato foliar das plantas de fumo infectadas com os respectivos isolados de PVY, obtido pela maceração dos tecidos foliares na presença de tampão fosfato 0,01M, pH 7,0 contendo sulfito de sódio na mesma molaridade, na proporção de (1:10 p/v). A inoculação foi feita friccionando-se esse extrato contendo o inóculo nas folhas previamente polvilhadas com carvão de silício (carburundum), com o devido cuidado para evitar contaminação entre os isolados. As folhas foram, então, lavadas em água corrente e as plantas permaneceram na casa de vegetação até a avaliação final dos sintomas.

2.5 Amplificação e seqüenciamento do gene da capa protéica dos isolados de PVY por RT-PCR

Os *primers* utilizados nesta etapa foram desenhados com base nas seqüências de PVY depositadas no GenBank, para amplificar um fragmento de 849 pb contendo o gene do capsídeo. Foram eles:

- Y-8549-F: GCGATACTTATGAAGTGCACC;
- Y-9397-R: CGTCCGGAGGAGCACTAC.

A extração do RNA, síntese e amplificação da fita de cDNA por PCR seguiu a mesma técnica descrita anteriormente na discriminação dos isolados.

2.6 Seqüenciamento e análise das seqüências

O DNA amplificado para cada um dos 14 isolados foi purificado diretamente do gel de agarose, utilizando o kit de purificação “GFX PCR DNA and *Gel Band Purification* kit” da Bioscience, seguindo-se o protocolo recomendado pelo fabricante. O seqüenciamento dos isolados foi realizado no Laboratório de Seqüenciamento de DNA da Embrapa Milho e Sorgo, localizada em Sete Lagoas, MG. As seqüências oriundas dos esferogramas foram analisadas pelo Programa BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) e os alinhamentos múltiplos foram feitos pelo programa CLUSTALW (<http://clustalw.genome.jp>), utilizando-se, para comparação, 24 dos isolados de PVY disponíveis no GenBank (Tabela 3). As árvores filogenéticas foram obtidas por meio do programa MEGA 4.0 (www.megasoftware.net) com bootstrap, considerando valores superiores a 2.000 repetições.

TABELA 3 Relação dos isolados de *Potato virus Y* (PVY) disponíveis no GenBank (NCBI, 2008), empregados para comparação com os isolados estudados. Lavras, MG, 2008.

Código Acesso	Origem	Estirpe	Autores
AB185832	Síria	PVY ^{N-Wi}	Chikh et al. (2007)
AB295479	Síria	PVY ^{NTN}	Chikh et al. (Não Publicado)
AB295478	Síria	PVY ^{NTN}	Chikh et al. (Não Publicado)
AB331544	Japão	PVY ^{NTN}	Ogawa et al. (2008)
AJ890345	Alemanha	PVY ^{NTN}	Schubert et al. (2007)
AJ390298	Dinamarca	PVY ^{NTN}	Boonham et al. (Não Publicado)
AM113988	Alemanha	PVY ^{N-Wi}	Schubert et al. (2007)
AM411503	Vietnã	N.imform.	Nguyen et al. (Não Publicado)
AY601680	China	PVY ^N	Ding et al. (Não Publicado)
AY742733	China	N.imform.	Na et al. (Não Publicado)
AY840082	Brasil	PVY ^{NTN}	Sawazaki et al. (Não Publicado)
DQ008213	EUA	PVY ^N	Lorenzen et al. (Não Publicado)
DQ157179	EUA	PVY ^{N:0}	Piche et al. (Não Publicado)
EF016294	Reino Unido	PVY ^{NTN}	Gow et al. (Não Publicado)
EF026076	EUA	PVY ^{N:0}	Baldauf et al. (Não Publicado)
EF027867	Reino Unido	N.imform.	Gow et al. (Não Publicado)
EF027868	Reino Unido	PVY ^N	Gow et al. (Não Publicado)
EF027892	Reino Unido	PVY ^{NTN}	Gow et al. (Não Publicado)
EU182576	China	PVY ^N	Wen et al. (Não Publicado)
S74813	Japão	N. imform.	Hataya et al. (1994)
U09509	Canadá	PVY ^O	Singh & Singh (1996)
U25672	China	N.imform.	Chu et al. (1992)
X92078	França	N.imform.	Le Romancer et al. (Não Publicado)
Z70239	Polônia	PVY ^O	Chachulska et al. (Não Publicado)

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Diagnose e identificação dos isolados de PVY

Todos os isolados reagiram positivamente com o anti-soro policlonal da Bioreba, confirmando a identidade do PVY. A reação de PCR empregando os *primers* descritos por Bonham et al. (2002) permitiu uma clara discriminação entre os isolados. A banda de 609 pb indicou os isolados de PVY^{NTN}, enquanto a banda de 280pb se referiu aos isolados da estirpe necrótica comum (PVY^N). Portanto, os isolados comuns são: BRE-EM, FOR-AG, SGS-AG, LUM-CE, MFE-AG, POL-AG, LAV-CL e os PVY^{NTN}: SAT-AG, COR-AG, SGT-AG, ALF-VI, IPU-MA, TAP-AG e ARA-MO (Figura 2). Diversos autores têm descrito diferentes conjuntos de *primers* para a detecção de estirpes e variantes genéticas do PVY no campo, devido à sua grande importância em praticamente todos os países em que se cultiva a batata (Nie & Sing, 2003; Glais et al., 2005; Balme-Sinibaldi et al., 2006; Schubert et al., 2007; Rigotti & Gurgeli, 2007).

Dos catorze isolados obtidos, oito estavam infectando a cv. Ágata, o que é compreensível por ser esta a cultivar mais plantada no Brasil. Como se pode observar, metade desses oito isolados foi classificada como PVY^{NTN}, mostrando uma ocorrência igual à da estirpe PVY^N. Desse modo, a sua ocorrência não parece estar ligada à suscetibilidade da cultivar. As três cultivares restantes infectadas com o isolado NTN foram a ‘Monalisa’, detectada em batata-semente produzida em Araxá, a ‘Markies’, de campo cultivado em Ipuiúna e a ‘Vivaldi’, de Alfenas. Considerando-se que os outros quatro isolados detectados na cv. Ágata vieram de São Gotardo, Coromandel, Sacramento e Tapira, nota-se que esse isolado está disseminado em praticamente todas as regiões produtoras de Minas Gerais. As outras três cultivares que estavam infectadas com o isolado necrótico comum foram a ‘Caesar’, de Luminárias, a ‘Emeraude’ de Bom

Repouso e um clone (LAV-CL) pertencente ao programa de melhoramento genético do Departamento de Biologia da UFLA, que foi infectado por ocasião da sua multiplicação no campo, em Lavras, MG. Os demais isolados N encontrados em 'Ágata' vieram de Presidente Olegário, São Gonçalo do Sapucaí, Maria da Fé e Formiga, mostrando que ambos os isolados estão espalhados pelas diversas regiões produtoras e, provavelmente, competem por sobrevivência e prevalência no campo.

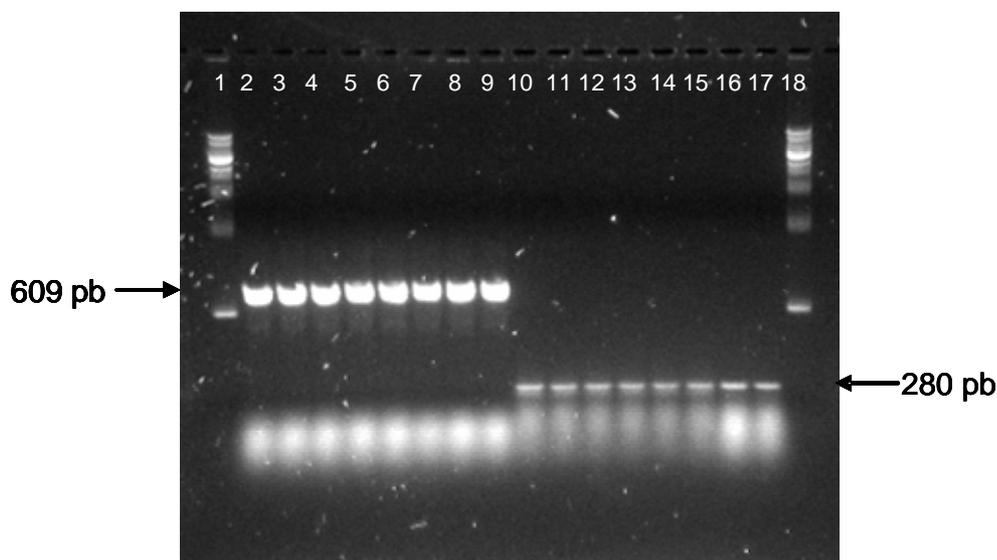


FIGURA 2 Análise eletroforética dos produtos de PCR amplificados com os *primers* desenhados por Boonham et al. (2002). 1 e 18: 1Kb ladder; 2: controle PVY^{NTN}; 3: SAT-AG, 4: COR-AG, 5: SGT-AG, 6: ALF-VI, 7: IPU-MA, 8: TAP-AG, 9: ARA-MO, 10: controle PVY^N; 11: BRE-EM, 12: FOR-AG, 13: SGS-AG, 14: LUM-CE, 15: MFE-AG, 16: POL-AG e 17: LAV-CL. Lavras, MG, 2008.

Quando o PVY^{NTN} foi detectado no Brasil (Souza-Dias et al., 1998, 1999) ele parecia estar localizado na região de Vargem Grande do Sul, no estado de São Paulo. Foi realizado um levantamento em Minas Gerais (Figueira, comunicação pessoal) e esse isolado se encontrava localizado em poucas regiões, principalmente no sul do estado, nas proximidades do estado de São Paulo. Entretanto, com base nestes resultados, pode-se concluir que está se disseminando rapidamente por todo o estado.

A variante PVY^{NTN} foi originalmente descrita em meados dos anos 1980 (Beczner et al., 1984), mas, na década seguinte, foi detectada na maioria dos países da Europa, no Líbano e em Israel (Weidemann & Maiss, 1996), Portugal (Serra & Weidemann, 1997), além da Itália (Tomassoli et al., 1998), América do Sul (Salazar et al., 2000) e América do Norte (McDonald & Sing, 1993, 1996). Isso mostra que esse isolado é de fácil disseminação e, com a importação constante de batata-semente de outros países, o Brasil sempre corre o risco de deixar entrar patógenos exóticos, que contribuem para onerar ainda mais os custos dos produtores de batata.

3.2 Inoculação em diversas hospedeiras

Os resultados da inoculação dos catorze isolados nas diversas espécies de plantas estão discriminados nas Tabelas 4 e 5. As espécies *Chenopodium quinoa*, *Nicandra physaloides*, *Gomphrena globosa* e *Datura stramonium* foram imunes a todos os isolados testados. Isso já era esperado para *G. globosa* e *D. stramonium* que, sabidamente, são imunes ao PVY (De Bokx & Huttinga, 1981; Moraes, 2003). Nóbrega & Silberschmidt (1944) também já haviam observado que os isolados de PVY por eles estudados não induziram sintomas em *N. physaloides*. Trabalhos realizados por Le Romancer et al. (1994) mostraram que *C. quinoa* não foi suscetível a isolados de PVY^{NTN}. Por outro lado, Moraes (2003) observou que alguns isolados necróticos foram capazes de infectar *C.*

quinoa, causando lesões locais, enquanto outros não foram capazes de induzir nenhuma reação nessa espécie. Todos os isolados necróticos aqui estudados não foram capazes de infectá-la.

As plantas de *C. amaranticolor* apresentaram sintomas de lesões locais quando inoculadas com todos os isolados PVY^N (Tabela 4; Figura 3A), o que não aconteceu quando foram inoculadas com os isolados PVY^{NTN}. Isso faz com que essa planta tenha um alto valor experimental, pois pode ser utilizada para fazer uma triagem inicial, visando a identificação entre os isolados necróticos do PVY. Le Romancer et al. (1994) também observaram que isolados de PVY^{NTN} não infectam essa espécie de planta.

As plantas de fumo (*N. tabacum*) cultivares Turkish NN (TNN), Sansun e White Burley reagiram com sintomas de diferentes intensidades, apresentando reações diferenciadas tanto entre os isolados de PVY^{NTN} como entre os isolados de PVY^N. Os sintomas de *N. tabacum* cv. TNN e *N. tabacum* cv. Sansun estão ilustradas nas Figuras 4 e 5. Os três isolados que apresentaram os sintomas mais fracos foram ARA-MO, PVY^{NTN}; LAV-CL e MFE-AG, PVY^N; tendo esse último induzido pontuações necróticas e enrugamento, ligeiramente mais fortes que os dois anteriores. Isolados de PVY causando sintomas fracos em fumo foram primeiramente detectados em Minas Gerais em meados de 1995 (Moraes et al., 1997) e, posteriormente, caracterizados como sendo, provavelmente, do tipo PVY^{N-Wi} (Moraes et al., 1999; Moraes, 2003) que, do mesmo modo que o PVY^{NTN} é considerado um recombinante entre as estirpes PVY^O e PVY^N (Glais et al., 2002). Esse isolado foi primeiramente encontrado na Polônia e descrito por Chrzanowska (1991). As principais diferenças encontradas por ele, em relação aos outros isolados, foram a sua sintomatologia e agressividade.

TABELA 4 Sintomas apresentados pelas espécies de plantas inoculadas com os isolados PVY^N coletados em Minas Gerais. Lavras, MG, 2008.

Sintomas provocadas por sete isolados de PVY nas espécies inoculadas*							
Espécies inoculadas	BRE-EM	SGS-AG	LUM-CE	MFE-AG	FOR-AG	POL-AG	LAV-CL
<i>Chenopodium quinoa</i>	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS
<i>Nicandra physaloides</i>	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS
<i>C. amaranticolor</i>	LL	LL	LL	LL	LL	LL	LL
<i>Gomphrena globosa</i>	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS
<i>Datura stramonium</i>	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS
<i>C. annuum</i> cv. Bastidon	M	M	M	M	M	M++	M
<i>Physalis floridana</i>	DF++,M	DF++,PN+,M	PC, M, ER+, DF	DF++, PN+, M	DF++, PN+, M	DF++, PN, ER, M	DF, M, PC'
<i>Nicotiana tabacum</i> cv. TNN	PN+, EN, ER, NN	PN+,ER,EN,NN	PN++, ER+, NN+, EN	PN+, NN, ER+, EN	PN+, ER+, EN, NN+	ER+, EN, NN, PN++	ER, PN, NN
<i>N. tabacum</i> cv. White Burley	PN, NN, ER+, EN	PN+, PC, ER+, EN	PC+, PN++, ER+, EN	PN+, EN, ER+, PC	PN+, PC, ER+, EN	EN, PC	PC, PN
<i>N. tabacum</i> cv. Havana	S/S	S/S	M	S/S	S/S	S/S	S/S
<i>N. tabacum</i> cv. Sansun	PN++, ER+, EN, NN	PN+, ER, EN, NN	NN, PN+, ER+, EN	ER, PN+	PN+, ER+, EN, NN	PN++, NN, ER+	ER, NN, PN
<i>N. rustica</i>	M	M	M	M	M	SS	SS
<i>N. glutinosa</i>	S,CN, BL, M, ER	CN, ER, M	CN, ER, M, BL	CN, M,	CN, ER, M	CN, ER, M	CN, ER, M

*CN- clareamento de nervura; DF- desfolha; EN- encarquilhamento; ER- enrugamento; BL- bolhosidade; LL- lesão local, M- mosaico; NN- necrose das nervuras; PC- pontos cloróticos; PN- pontuações necróticas; S- subdesenvolvimento; SS- sem sintomas; sintomas: () fraco; (+) intermediário; (++) forte.

TABELA 5 Sintomas apresentados pelas espécies de plantas inoculadas com os isolados PVY^{NTN} coletados em Minas Gerais. Lavras, MG, 2008.

Sintomas provocadas por sete isolados de PVY nas espécies inoculadas*							
Espécies inoculadas	SGO-AG	ALF-VI	IPU-MA	TAP-AG	ARA-MO	SAT-AG	COR-AG
<i>Chenopodium quinoa</i>	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS
<i>Nicandra physaloides</i>	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS
<i>C. amaranticolor</i>	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS
<i>Gomphrena globosa</i>	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS
<i>Datura stramonium</i>	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS
<i>C. annuum</i> cv. Bastidon	M++	M++	M	M++	M	M++	M++
<i>Physalis floridana</i>	ER,DF, BL, M	M	ER+, DF, M, BL	M, BL, ER, DF	M, BL	M, ER, BL, DF	DF+, PN, BL, M
<i>Nicotiana tabacum</i> cv. TNN	PN++, NN+, ER, EN	ER+, EN, NN, PN++	NN, PN+, ER, EN	NN, PN+, EN, ER	EN, ER, NN, PN	PN++, NN, ER+, EN	PN++, NN, ER+, EN
<i>N. tabacum</i> cv. White Burley	PC+, PN+, EN, ER+	EN, PC, PN+, ER	PC+, PN+, ER+, EN	PN+, EN+, ER, PC+	PN, PC+, ER	PC+, PN+, ER+, EN	PC+, PN+, ER, EN
<i>N. tabacum</i> cv. Havana	NN, ER	NN, ENR	NN, ER	NN, ENR	S/S	NN, ENR	ENR, PN
<i>N. tabacum</i> cv. Sansun	PN++, NN+, ER, EN	NN, PN+, ER+	PN++, NN, ER, EN	PN++, NN, ER, EN	PN+, ER	PN+, NN+, ER, EN	NN, EN, ER+, PN+
<i>N. rustica</i>	M+	M	M	M	M	M+	M
<i>N. glutinosa</i>	CN, M, ER, BL	S, CN, BL, M, PN	CN, ER, BL, M	S, BL, CN, ER, M	S, CN, BL, M	S, CN, BL, M	CN, ER, M

*CN- clareamento de nervura; DF- desfolha; EN- encarquilhamento; ER- enrugamento; BL- bolhosidade; LL- lesão local, M- mosaico; NN- necrose das nervuras; PC- pontos cloróticos; PN- pontuações necróticas; S- subdesenvolvimento; SS- sem sintomas; sintomas: () fraco; (+) intermediário; (++) forte.

Desde que esse isolado chegou ao Brasil, foi descrito como um vírus causador de sintomas fracos em batata, quase imperceptível para olhos pouco treinados. Entretanto, tinha uma alta capacidade de disseminação no campo, tendo sido um dos isolados que mudaram o panorama das viroses em batata no Brasil, pois, até então, o PVY nunca havia sido encontrado em altas incidências nos campos de batata (Moraes et al., 1997; Moraes et al., 1999; Moraes, 2003). Uma das características dele é não reagir com o anti-soro monoclonal para o PVY^N, apesar de induzir sintomas de necrose leve em plantas de fumo (Moraes et al. 1999; Moraes, 2003). Como um dos isolados, o ARA-MO é do tipo NTN; os outros dois poderiam ser do tipo Wilga, o que evidencia sua permanência e importância no campo.

Plantas de fumo ‘Havana’ e de *N. rustica* reagiram com sintomas fracos, para boa parte dos isolados, não tendo portanto, sido consideradas boas indicadoras para a diferenciação dos isolados. Resultados parecidos foram encontrados por outros autores, que também não consideraram essas plantas boas indicadoras para o PVY (Nóbrega & Silberschmidt, 1944; Moraes, 2003; Camargos et al., 2007). Entretanto, plantas da cv. Havana não foram suscetíveis aos isolados POL-AG e LAV-CL, o que não deixa de ser uma diferença de comportamento que merece ser explorada.

Physalis floridana foi uma espécie que, de maneira geral, apresentou sintomas uniformes como mosaico, enrugamento, desfolha e, em alguns casos, bolhosidade, estando de acordo com resultados obtidos por Moraes (2003), que também verificou esses sintomas de intensidade variada. Porém, a espécie de pimentão cv. Bastidon apresentou sintomas de mosaico em diferentes intensidades, sendo susceptível tanto aos isolados PVY^N como aos PVY^{NTN}. Na Figura 6 tem ilustrado a variação de sintomas ocasionados nessa cultivar, provocados por dois isolados da variante NTN. Esses resultados contradizem os obtidos por Le Romancer et al. (1994), que conseguiram infectar essa cultivar

apenas quando inocularam isolados de PVY^{NTN}. Entretanto, concordam com os obtidos por Truta et al. (2004) que também conseguiram infectar plantas de pimentão cv. Bastidon com um isolado de PVY^N. Já as plantas de *Nicotiana glutinosa*, apresentaram sintomas variados desde clareamento de nervura com mosaico leve, até subdesenvolvimento associado a outros sintomas (Figura 3B).

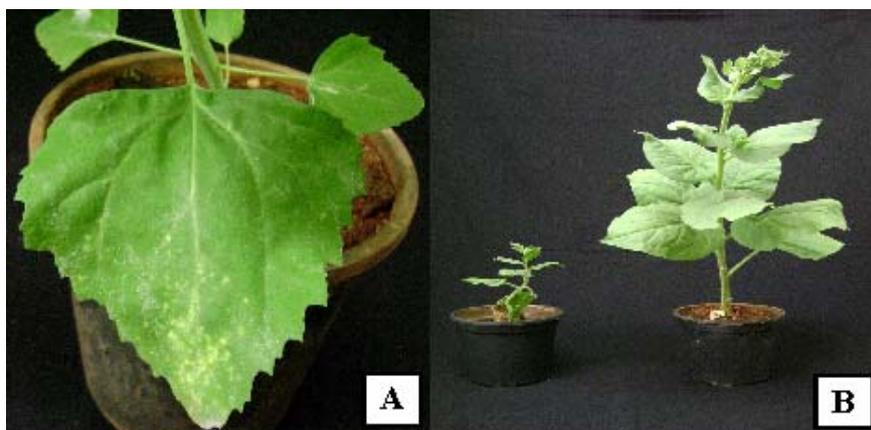


FIGURA 3 (A) Planta de *Chenopodium amaranticolor* com sintoma de lesão local causada por um isolado pertencente à estirpe necrótica comum do PVY (B) Planta de *Nicotiana glutinosa* com subdesenvolvimento, provocado por um isolado pertencente à estirpe necrótica comum (esquerda) comparada à planta sadia de mesma idade (direita). Lavras, MG, 2008.



FIGURA 4 Plantas de *Nicotiana tabacum* cv. TNN, mostrando sintomas de diferentes intensidades causados pelo *Potato virus Y* quando inoculadas com dois isolados da estirpe necrótica comum: (A) sintoma fraco, (B) mostrando destaque para o sintoma fraco e (C) sintoma severo.

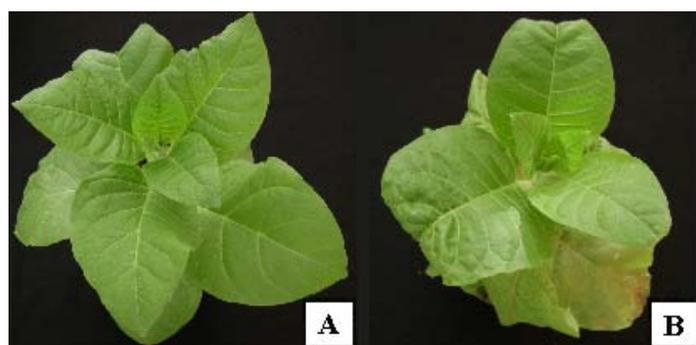


FIGURA 5 Plantas de *Nicotiana tabacum* cv. Sansun apresentando (A) sintoma fraco e (B) sintoma severo, mostrando a diferença nos sintomas induzidos nessa espécie quando inoculada com dois isolados da variante NTN. Lavras, MG, 2008.

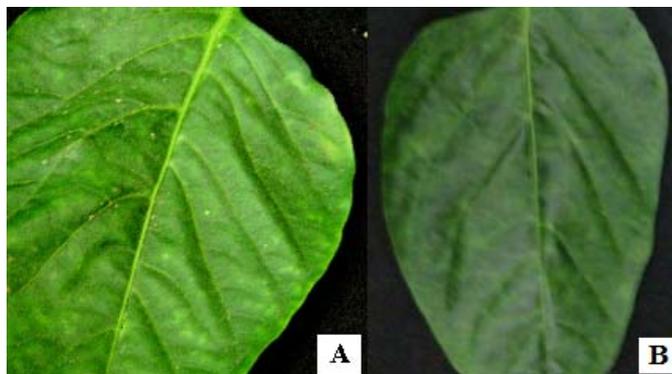


FIGURA 6 Folhas de pimentão cv. Bastidon apresentando (A) mosaico fraco e (B) mosaico forte, mostrando a diferença nos sintomas induzidos nessa espécie quando inoculada com dois isolados da variante NTN. Lavras, MG, 2008.

3.3 Caracterização molecular dos 14 isolados estudados

Com o par de *primers* desenhado, foi possível amplificar um fragmento de 849 pb, que foi seqüenciado e analisado. Fez-se um alinhamento múltiplo de nucleotídeos e de aminoácidos apenas entre os 14 isolados estudados e entre esses e outros 24 escolhidos entre os que estão disponíveis no banco de dados do GenBank. Quando se fez a comparação entre os sete isolados de PVY^N (Tabela 6), a menor identidade observada foi de 91%, entre o isolado BRE-EM, de Bom Repouso e o MFE-AG, de Maria da Fé. A maior identidade foi de 98%, observada entre o isolado de São Gonçalo do Sapucaí (SGS-AG) e os isolados de Formiga (FOR-AG), de Lavras (LAV-CL) e de Presidente Olegário (POL-AG). A menor identidade entre os isolados de PVY^{NTN} foi de 94%, entre o isolado de Alfenas (ALF-VI) e o de Coromandel (COR-AG) e a maior de 98%, entre os isolados de Ipuíúna, Sacramento (SAT-AG), São Gotardo (SGT-AG) e Tapira (TAP-AG). Como se pode observar, não parece que essa maior identidade esteja ligada à proximidade de regiões do estado. Quando se

compararam os isolados PVY^N com os de PVY^{NTN}, as identidades foram mais baixas, variando entre 87% e 91%.

Na comparação entre os aminoácidos da capa protéica dos 14 isolados de PVY estudados (Tabela 7), a menor identidade entre os isolados PVY^N foi 86% entre BRE-EM e MFE-AG, mostrando que a substituição de nucleotídeos gerou uma alteração ainda maior nos aminoácidos (91 → 86%), o que é denominado de substituição sinônima (Nei & Gojobori, 1986). A maior identidade foi de 98% e ocorreu entre os isolados de Presidente Olegário, Formiga, Lavras e São Gonçalo do Sapucaí. Comparando-se os isolados de PVY^{NTN}, a menor identidade foi de 90%, novamente entre os isolados de Alfenas e Coromandel, mostrando também um tipo de alteração sinônima. A maior identidade foi de 98%, entre os isolados de Sacramento, São Gotardo e Tapira. Na comparação entre os isolados PVY^N e PVY^{NTN}, as identidades variaram entre 84% e 92%.

TABELA 6 Porcentagem de identidade entre os nucleotídeos do gene da capa protéica dos 14 isolados de *Potato virus Y* estudados. Lavras, MG, 2008.

Isolados	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
1 ALF-VI	96	88	94	88	96	88	88	87	89	97	89	97	97
2 ARA-MO		87	96	87	96	88	87	87	88	96	88	96	96
3 BRE-EM			87	94	88	95	94	91	96	89	95	89	89
4 COR-AG				87	95	88	87	88	88	95	88	95	95
5 FOR-AG					89	97	96	92	97	89	98	90	89
6 IPU-MA						90	89	88	90	98	90	98	98
7 LAV-CL							97	94	98	90	98	90	90
8 LUM-CE								94	97	90	97	89	89
9 MFE-AG									93	88	93	88	88
10 POL-AG										90	98	91	91
11 SAT-AG											90	98	98
12 SGS-AG												91	91
13 SGT-AG													99

Quando se compararam os nucleotídeos dos 14 isolados estudados com os isolados do GenBank (Tabela 8), notou-se que houve maior variabilidade quando se comparou o PVY^{NTN} com o PVY^N e entre isolados de PVY^N com PVY^N, com as porcentagens de identidade entre 87% e 99%. No caso da variação entre isolados de PVY^{NTN}, essa variação ficou dentro do esperado, ou seja, entre 91% e 99%. Da mesma forma, os isolados PVY^{NTN} do GenBank apresentam uma identidade, entre si, de 91% a 99%, enquanto que, quando se considera a comparação entre esses e os de PVY^N e entre eles mesmos, a identidade varia entre 88% e 99%.

Os isolados LAV-CL e MFE-AG, confirmando os resultados observados em plantas de fumo, que reagiram com sintomas fracos, apresentaram altas identidades, entre 93% e 99%, com os isolados AB185832, da Síria e o isolado AM113988, da Alemanha, que são descritos como isolados PVY^{N-Wi}. O mesmo foi observado na identidade de aminoácidos, que foi de 91% a 98% (Tabela 9).

TABELA 7 Porcentagem de identidade entre os aminoácidos do gene da capa protéica dos 14 isolados de *Potato virus Y* estudados. Lavras, MG, 2008.

Isolados	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
1 ALF-VI	92	86	90	88	94	88	88	86	89	95	89	94	94
2 ARA-MO		84	93	85	92	86	85	84	87	92	87	92	93
3 BRE-EM			83	91	86	91	90	86	92	87	92	87	87
4 COR-AG				86	92	86	86	86	87	92	86	91	92
5 FOR-AG					90	96	94	89	97	91	98	91	90
6 IPU-MA						91	90	86	92	97	91	97	97
7 LAV-CL							95	91	98	92	97	92	91
8 LUM-CE								89	95	90	94	89	89
9 MFE-AG									90	87	89	86	87
10 POL-AG										92	98	92	92
11 SAT-AG											92	98	98
12 SGS-AG												92	92
13 SGT-AG													98

Observando-se com cuidado os isolados depositados no GenBank, foi possível verificar que alguns não devem ter sido apropriadamente classificados, de modo que, provavelmente, são isolados de PVY^{NTN}. Por exemplo, o isolado EF027868 do Reino Unido, que é descrito como necrótico comum, apresenta identidade de 87% com o BRE-EM e com o LUM-CE do Brasil e 89% com outros necróticos do GenBank, mas apresenta de 93% a 96% de identidade com os PVY^{NTN} deste estudo e até 99% de identidade com isolados desse tipo no GenBank (Tabela 8).

TABELA 8 Porcentagem de identidade na seqüência de nucleotídeos do gene da capa protéica entre os quatorze isolados estudados em comparação com a seqüência de outros 24 isolados de *Potato virus Y* depositados no GenBank. Lavras, MG, 2008.

Isolados	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	
1 ALF-VI	89	97	97	95	97	95	89	97	97	89	92	89	89	97	89	89	95	97	95	95	88	88	96	89	
2 ARA-MO	89	96	96	94	96	94	88	96	96	88	91	88	88	96	88	88	93	96	94	94	88	88	95	88	
3 BRE-EM	96	89	89	87	89	87	96	89	89	95	92	96	96	89	95	96	87	89	89	87	94	94	88	95	
4 COR-AG	88	96	96	93	96	93	88	96	95	88	91	88	88	96	88	88	93	96	93	94	88	87	95	88	
5 FOR-AG	98	90	90	88	90	88	97	90	90	97	93	97	97	90	97	98	88	90	90	88	95	96	89	96	
6 IPU-MA	90	99	98	96	98	96	90	98	98	90	93	90	90	98	90	90	95	98	96	96	90	89	97	90	
7 LAV-CL	99	90	91	89	90	89	98	90	91	98	95	98	99	90	99	98	88	91	91	89	96	97	90	97	
8 LUM-CE	98	89	90	88	89	88	97	89	90	97	93	97	98	89	98	97	87	90	90	88	95	96	89	96	
9 MFE-AG	94	88	88	86	88	86	93	88	88	93	91	93	94	88	94	94	96	88	89	86	92	92	87	93	
10 POL-AG	99	91	91	89	91	89	99	91	91	99	94	99	99	91	99	99	89	91	92	89	97	97	90	98	
11 SAT-AG	91	99	99	96	99	96	90	99	99	91	94	91	91	99	91	91	96	99	96	97	90	90	98	90	
12 SGS-AG	98	91	91	89	91	89	98	91	91	98	94	98	98	91	98	99	89	91	91	89	97	97	90	97	
13 SGT-AG	91	99	99	96	99	96	91	99	99	91	93	91	91	99	91	91	96	99	97	97	90	90	98	90	
14 TAP-AG	91	99	98	96	98	96	91	98	98	91	93	91	91	98	91	91	96	99	96	97	90	90	97	90	
15 AB185832		91	91	89	91	89	99	91	91	99	94	99	99	91	99	99	89	91	92	89	97	97	90	98	
16 AB295479			99	97	99	97	91	99	99	91	94	91	91	99	91	91	96	99	97	97	90	90	98	90	
17 AB295478				96	99	96	91	99	99	91	94	91	91	99	91	91	96	99	97	97	91	90	98	91	
18 AB331544					96	99	89	96	96	89	92	89	89	96	89	89	99	97	96	98	89	88	95	89	
19 AJ890345						96	91	99	99	91	94	91	91	91	91	91	96	99	97	97	90	90	98	90	
20 AJ390298							89	96	96	89	92	89	89	96	89	89	99	97	96	98	89	88	95	89	
21 AM113988								91	91	99	94	99	99	91	99	99	89	91	92	89	97	97	90	98	
22 AM411503									99	91	94	91	91	99	91	91	96	99	97	97	90	90	98	90	
23 AY601680										91	94	91	91	99	91	91	96	99	97	97	90	90	98	90	
24 AY742733											94	99	99	91	99	99	89	91	92	89	97	97	90	98	
25 AY840082												90	94	94	94	95	92	94	94	92	95	94	93	94	
26 DQ008213														99	91	99	99	89	91	92	89	97	97	90	98
27 DQ157179															91	99	99	89	91	92	89	97	97	90	98
28 EF016294																91	91	96	99	97	97	90	90	98	90
29 EF026076																	99	89	91	92	89	97	97	90	98
30 EF027867																		89	91	91	89	97	97	90	98
31 EF027868																			96	96	98	88	88	95	88
32 EF027892																				97	97	90	90	98	90
33 EU182576																					95	91	91	96	91
34 S748B																						88	88	96	89
35 U09509																							97	90	97
36 U25672																								90	97
37 X92078																									90

TABELA 9 Porcentagem de identidade na seqüência de aminoácidos do gene da capa protéica entre os quatorze isolados estudados em comparação com a seqüência de outros 24 isolados de *Potato virus Y* depositados no GenBank. Lavras, MG, 2008.

Isolados	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38
1 ALF-VI	89	95	95	95	95	95	89	95	95	89	92	89	89	95	89	89	95	95	95	94	88	87	94	88
2 ARA-MO	88	93	93	93	93	93	87	93	93	87	90	87	88	93	88	87	93	93	93	91	87	86	92	86
3 BRE-EM	92	88	88	87	87	88	93	87	88	92	90	93	92	88	92	92	88	88	88	88	91	90	87	91
4 COR-AG	88	92	92	92	92	92	87	92	92	87	89	87	88	92	88	87	92	92	92	91	86	85	91	86
5 FOR-AG	97	91	92	91	91	91	97	91	92	97	94	97	97	91	97	98	91	92	91	91	95	94	91	95
6 IPU-MA	92	98	98	98	98	98	92	98	98	92	94	92	92	97	92	91	97	98	98	96	91	90	97	91
7 LAV-CL	98	92	93	92	92	92	98	92	93	98	94	91	98	92	98	97	92	93	92	93	95	95	92	96
8 LUM-CE	96	90	90	89	89	90	95	89	90	95	91	95	96	90	96	95	89	90	90	90	93	92	89	94
9 MFE-AG	91	87	87	87	87	91	87	87	91	88	91	91	87	91	90	86	87	87	88	88	88	86	89	
10 POL-AG	99	93	94	93	93	99	93	94	98	95	99	99	99	93	99	98	93	94	93	94	97	96	92	98
11 SAT-AG	93	99	98	98	98	99	92	98	98	92	95	92	93	98	93	92	98	98	99	97	91	92	97	92
12 SGS-AG	98	92	93	92	92	92	98	92	93	98	95	98	98	92	98	99	92	93	92	92	97	95	92	97
13 SGT-AG	92	98	98	98	98	98	92	98	98	92	95	92	92	98	92	92	98	98	98	97	91	90	97	91
14 TAP-AG	92	98	98	98	98	98	92	98	98	92	95	92	92	98	92	92	98	98	98	97	91	91	97	92
15 AB185832	98	94	93	93	94	99	93	94	99	95	99	100	94	100	98	93	94	94	94	97	96	93	97	
16 AB295479		99	99	99	100	93	99	99	93	96	93	94	99	94	93	99	99	100	98	92	91	98	92	
17 AB295478			99	99	99	94	99	100	94	96	94	94	99	94	93	98	100	99	98	92	92	98	93	
18 AB331544				99	99	93	99	99	93	95	93	93	98	93	92	98	99	99	97	92	91	98	92	
19 AJ890345					99	93	99	99	93	95	93	93	98	93	92	98	99	99	97	92	91	98	92	
20 AJ390298						93	99	99	93	96	93	94	99	94	93	99	99	100	98	92	91	98	92	
21 AM113988							93	94	95	95	100	99	93	99	99	93	94	93	94	97	96	92	98	
22 AM411503								99	93	95	93	93	98	93	92	98	99	99	97	92	92	98	92	
23 AY601680									94	96	94	94	99	94	93	98	100	99	98	93	92	98	93	
24 AY742733										94	99	99	93	99	98	92	94	93	94	96	95	92	97	
25 AY840082											95	95	96	95	95	95	96	96	96	95	93	95	94	
26 DQ008213													99	93	99	99	93	94	93	94	97	96	92	98
27 DQ157179														94	100	98	93	94	94	94	97	96	93	97
28 EF016294															94	93	98	99	99	98	92	91	98	92
29 EF026076																98	93	94	94	94	97	96	93	97
30 EF027867																	92	93	93	93	97	95	92	97
31 EF027868																		98	99	97	92	91	97	92
32 EF027892																			99	98	92	92	98	93
33 EU182576																				98	92	91	98	92
34 S74813																					92	92	97	93
35 U09509																						95	91	96
36 U25672																							91	96
37 X92078																								92

Isso pode ter acontecido porque, geralmente, o modo de se fazer a diferenciação visual entre os isolados necróticos comuns e o PVY^{NTN} é a presença de anéis necróticos nos tubérculos. Entretanto, nem sempre, esses sintomas estão presentes. Le Romancer & Nedellec (1997) investigaram o efeito do PVY^{NTN} em 33 cultivares de batata e observaram que os sintomas induzidos dependem do genótipo da planta, do isolado viral e das condições ambientais. Muitas vezes esses anéis somente aparecem depois de terem sido armazenados por pelo menos três meses na câmara fria.

A árvore filogenética construída com base nos nucleotídeos, para os 14 isolados estudados (Figura 6), mostrou uma clara separação entre os isolados PVY^{NTN} e os PVY^N. Dentre os primeiros, os isolados ALF-VI, ARA-MO e COR-AG se mantiveram sozinhos e se separaram dos demais. Entre os PVY^N, os isolados MFE-AG e BRE-EM ficaram separados de todos os demais. A mesma tendência foi observada na árvore construída com base na seqüência de aminoácidos, com os isolados ARA-MO e COR-AG se agrupando no mesmo clado, porém separadamente dos demais, da mesma forma que os isolados MFE-AG, BRE-EM e LUM-CE, do grupo dos PVY^N (Figura 7). Na comparação dos nucleotídeos dos 14 isolados com os do GenBank, os isolados ARA-MO e COR-AG formaram um subgrupo, enquanto os demais isolados se distribuíram no segundo subgrupo (Figura 8). Vale lembrar que os dois foram provenientes das regiões vizinhas do Triângulo Mineiro e Alto Paranaíba.

Os isolados SGT-AG, SAT-AG, TAP-AG e IPU-MA apresentaram proximidade com isolados da França e do Vietnã. O isolado tipo Wilga MFE-AG não se agrupou próximo ao LAV-CL, sendo esse último o mais próximo ao isolado Wilga da Alemanha, o AM113988 utilizado para comparação. Existe uma suspeita de que esse isolado tenha chegado ao Brasil via batata-semente infectada, proveniente da Alemanha.

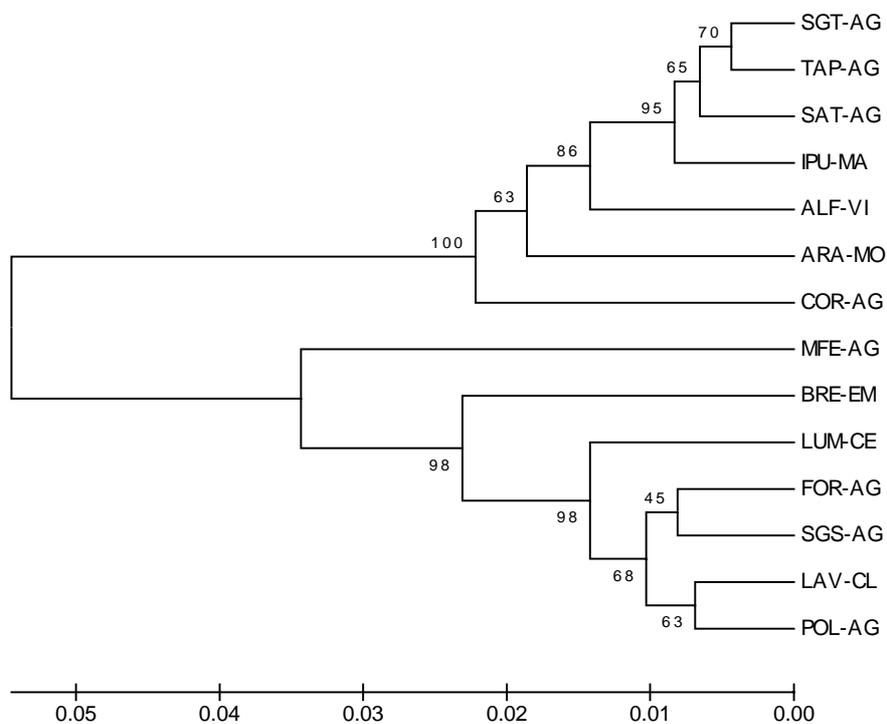


FIGURA 6 Árvore filogenética construída com base na seqüência de nucleotídeos do fragmento estudado dos quatorze isolados brasileiros de *Potato virus Y*. Os valores do bootstrap foram obtidos pelo programa MEGA e UPGMA, com 2.000 repetições. Lavras, MG, 2008.

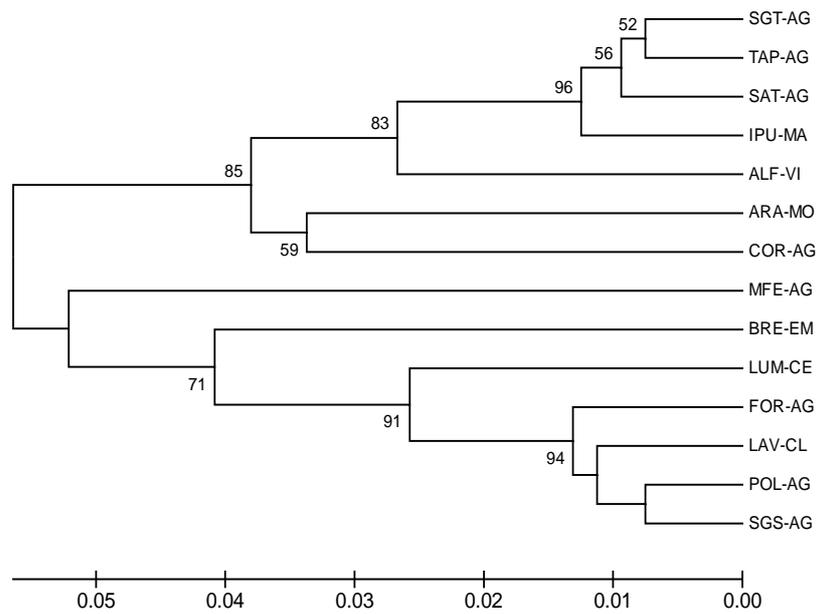


FIGURA 7 Árvore filogenética construída com base na seqüência de aminoácidos do fragmento estudado dos quatorze isolados brasileiros de *Potato virus Y*. Os valores do bootstrap foram obtidos pelo programa MEGA e Neighbor Joining, com 2.000 repetições. Lavras, MG, 2008.

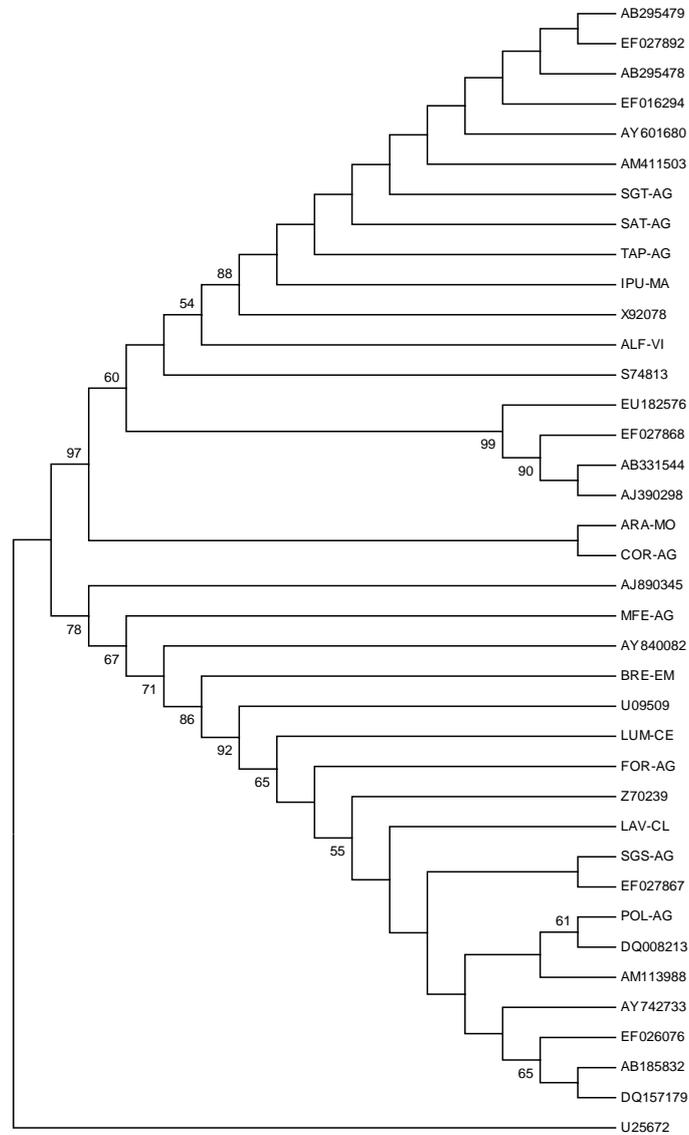


FIGURA 8 Árvore filogenética construída com base na seqüência de nucleotídeos do fragmento estudado dos quatorze isolados brasileiros de *Potato virus Y* e dos isolados do GenBank empregados neste estudo. Os valores do bootstrap foram obtidos pelo programa MEGA e UPGMA, com 2.000 repetições. Lavras, MG, 2008.

Na árvore baseada no alinhamento de aminoácidos (Figura 9), os isolados MFE-AG e BRE-EM também se agruparam separadamente de todos os isolados do GenBank e o LAV-CL se agrupou no clado próximo ao isolado Wilga da Síria. Essa variabilidade nem sempre é de fácil entendimento, uma vez que esses isolados apresentam alto grau de mutação e diferenciação e já se encontram no Brasil há mais de 10 anos. Ogawa et al. (2008), comparando a população de isolados do PVY do Japão com os da Europa e da América do Norte, observaram que a população dos isolados de PVY^{NTN} do Japão era diferente daquelas da Europa e dos Estados Unidos. Esses autores concluíram que os isolados foram introduzidos recentemente no Japão e se disseminaram a partir de uma população original. O Brasil, além de se receber material de diversos países da Europa, dos Estados Unidos e do Canadá, ainda apresenta condições climáticas diversas, nas diferentes regiões, o que pode causar efeitos ambientais antagônicos, podendo influenciar distintamente os genomas dos isolados de PVY no material multiplicado no campo e nas hospedeiras naturais e selvagens.

De qualquer forma, é interessante notar que os isolados de Maria da Fé e Bom Repouso, municípios situados na região Sul de Minas, formam indivíduos distintos, porém, parecem, com base na árvore filogenética construída a partir da seqüência dos aminoácidos, terem os mesmos ancestrais da maioria dos isolados comparados, com exceção de dois isolados da China (um necrótico e outro sem identificação) e outro PVY^{NTN} do Brasil, o AY840082.

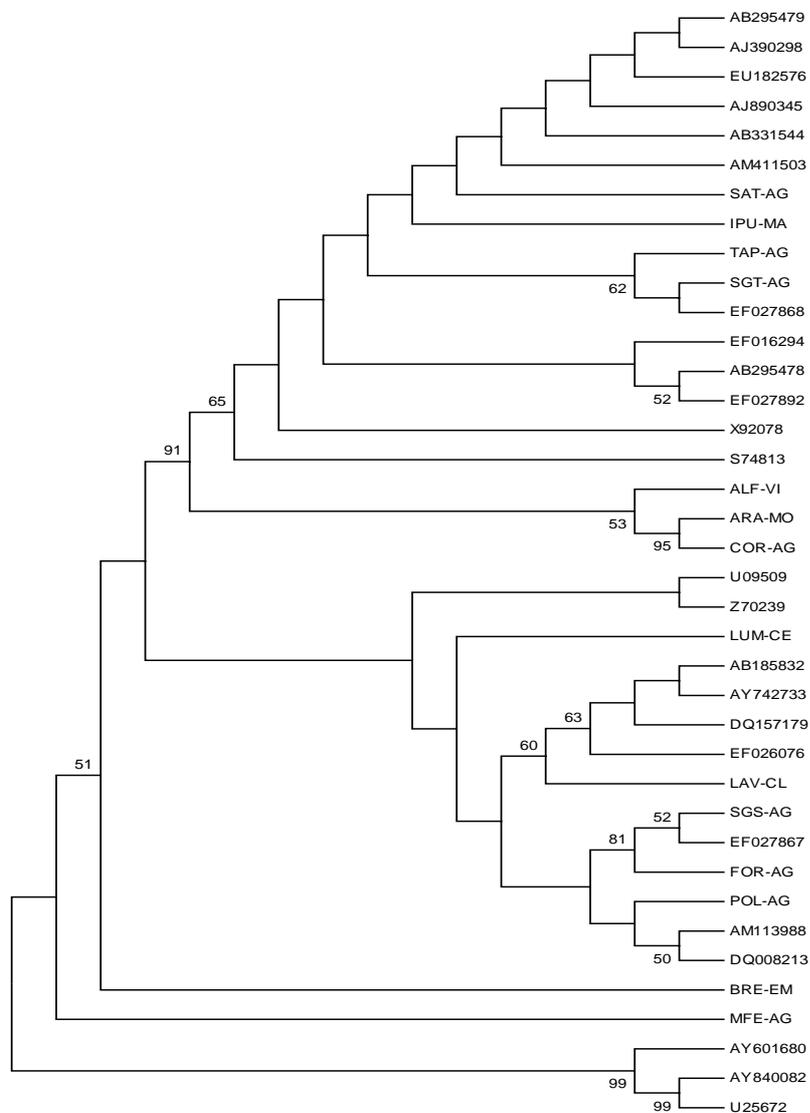


FIGURA 9 Árvore filogenética construída com base na seqüência de aminoácidos do fragmento estudado dos quatorze isolados brasileiros de *Potato virus Y* e dos isolados do GenBank empregados neste estudo. Os valores do bootstrap foram obtidos pelo programa MEGA e Neighbor Joining, com 2.000 repetições. Lavras, MG, 2008.

4 CONCLUSÕES

1. Entre os 14 isolados detectados nas regiões produtoras de Minas Gerais, todos eles pertenciam à estirpe PVY^N. Dois deles apresentaram alta semelhança com o variante Wilga (PVY^{N-Wi}) e sete foram caracterizados como o variante PVY^{NTN}.
2. As plantas de *Gomphrena globosa*, *Datura stramonium*, *Chenopodium quinoa* e *Nicandra physaloides* foram imunes aos isolados estudados neste trabalho.
3. As plantas de fumo foram as melhores indicadoras para os isolados estudados, reagindo com sintomas cuja severidade variou com o isolado, sendo os isolados ARA-MO, LAV-CL e MFE-AG os menos severos.
4. Todos os isolados estudados infectaram plantas de pimentão cv. Bastidon.
5. Plantas de *Chenopodium amaranticolor* foram suscetíveis apenas aos isolados de PVY^N.
6. Com base na seqüência de nucleotídeos e aminoácidos, três isolados pertencentes à variante PVY^{NTN} (ALF-VI, ARA-MO e COR-AG) e dois à estirpe PVY^N (MFE-AG e BRE-EM) se agruparam separadamente dos demais isolados brasileiros pertencentes às respectivas estirpes, mostrando um maior distanciamento genético entre eles.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRIANUAL. **Anuário da agricultura brasileira**. São Paulo: FNP Consultoria, 2008. 502 p.

AFGC PROJECT. Protocols. 2002. Disponível em: <<http://www.arabidopsis.org/portals/masc/AFGC/RevisedAFGC/site2RnaL.htm#iisolation>>. Acesso em: 13 mar. 2008.

BALME-SINIBALDI, V.; TRIBODET, M.; CROIZAT, F.; LEFEVRE, P.; KERLAN, C.; JACQUOT, E. Improvement of *Potato virus Y* (PVY) detection and quantitation using PVY^N and PVY^O specific real-time RT-PCR arrays. **Journal of Virological Methods**, Amsterdam, v. 134, n. 1/2, p. 261-266, 2006.

BECZNER, L.; HORVÁTH, J.; ROMHÁNYI, I.; FÖRSTER, H. Studies on the etiology of tuber necrotic ringspot disease in potato. **Potato Research**, Netherlands, v. 27, n. 3, p. 339-352, 1984.

BEEMSTER, A. B. R.; DE BOKX, J. A. Survey of properties and symptoms. In: DE BOKX, J. A.; WANT, J. P. H. van der (Ed.). **Viruses of potato and seed potato production**. 2. ed. Wageningen: PUDOC, 1987. p. 84-113.

BLANCO-URGOITI, B.; TRIBODET, M.; LECLERE, S.; PONZ, F.; PÉREZ DE SAN ROMÁN, C.; LEGORBURU, F. J.; KERLAN, C. Characterization of potato potyvirus Y (PVY) isolates from seed potato batches. Situation of the NTN, Wilga and Z isolates. **European Journal of Plant Pathology**, Netherlands, v. 104, n. 8, p. 811-819, 1998.

BOONHAM, N.; WALSH, K.; PRESTON, S.; NORTH, J.; SMITH, P.; BARKER, I. The detection of tuber necrotic isolates of *Potato virus Y*, and the accurate discrimination of PVY^O, PVY^N and PVY^C strains using RT-PCR. **Journal of Virological Methods**, Amsterdam, v. 102, v. 1/2, p. 103-112, 2002.

CÂMARA, F. L. A.; CURPETINO, F. P.; FILGUEIRA, F. A. R. Redução na produtividade de cultivares de batata causada por vírus. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 4, n. 2, p. 8-10, 1986.

CAMARGOS, V. N.; FIGUEIRA, A. R.; PEREIRA, S. L.; MOREIRA, C. N.; RAMALHO, T. O. Caracterização biológica de isolados de *Potato virus Y* (PVY) que induzem necrose superficial em tubérculos de batata. In: ENCONTRO NACIONAL DE PRODUÇÃO E ABASTECIMENTO DA BATATA, 13., 2007, Holambra, SP. **Resumos...** Holambra: ABBA, 2007. Disponível em: <http://www.abbabatabrasileira.com.br/images/eventos/arquivos/resumo_39.pdf>. Acesso em: 10 dez. 2007.

CHRZANOWSKA, M. New isolates of the necrotic strain of *Potato virus Y* (PVY^N) found recently in Poland. **Potato Research**, Wageningen, v. 34, n. 2, p. 179-182, 1991.

CHRZANOWSKA, M. Differentiation of *Potato virus Y* (PVY) isolates. **Phytopathologia Polonica**, Poznań, v. 8, n. 20, p. 15-20, 1994.

CLARK, M. F.; ADAMS, A. N. Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. **Journal of General Virology**, Great Britain, v. 34, n. 3, p. 475-483, 1977.

COSTA, A. S. Moléstias de vírus da batata. **Boletim do Campo**, Rio de Janeiro, v. 21, n. 190, p. 68-83, 1965.

COSTA, A. S.; FORSTER, R. Nota sobre a moléstia de vírus do fumo denominada faixa das nervuras. **Bragantia**, Campinas, v. 2, p. 55-76, 1942.

CUPERTINO, F. P.; COSTA, A. S. Avaliação das perdas causadas por vírus na produção da batata I- vírus do enrolamento da folha. **Bragantia**, Campinas, v. 29, n. 31, p. 337-345, 1970.

DE BOKX, J. A.; HUTTINGA, H. *Potato virus Y*. Kew: Commonwealth Mycological Institute/Association of Applied Biologists, 1981. 6 p. (Descriptions of plant viruses, 242).

FEDALTO, A. A. **Avaliação da produtividade de tubérculos de plantas oriundas de sementes sexuadas de batata (*Solanum tuberosum* L.) e da primeira geração de propagação vegetativa**. 1982. 70 f. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

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

FIGUEIRA, A. R.; MORAES, F. R. H.; PINTO, A. C. S. New PVY necrotic strain is causing great losses in Brazil: abstracts of presentation - 1996 APS Meeting. Indianópolis: APS, 1996a. Abstract, p.85, 357 p.

FIGUEIRA, A. R.; PINTO, A. C. S. Estirpe necrótica do vírus Y da batata em sementes importadas está causando problemas ao bataticultor mineiro. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLGIA, 28., 1995, Ilhéus, BA. **Anais...** Ilhéus: SBF, 1995. p. 299.

FIGUEIRA, A. R.; PINTO, A. C. S.; MORAES, F. H. R. Alta incidência da nova estirpe necrótica do vírus Y da batata está ocorrendo em todos os estados produtores do Brasil. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLGIA, 29., 1996, Campo Grande, MS. **Anais...** Campo Grande: SBF, 1996b. p. 432.

FONSECA, L. N. **Estudo da diversidade de *Potato virus Y (PVY)* em batata (*Solanum tuberosum L.*), no Brasil.** 2003. 72 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Genômicas e Biotecnologia) - Universidade Católica de Brasília, Brasília, DF.

FONSECA, L. N.; INOUE-NAGATA, A. K.; NAGATA, T.; SINGH, R. P.; ÁVILA, A. C. Diferenciação de estirpes de *Potato virus Y (PVY)* por RT-PCR. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 23, n. 4, p. 904-910, 2005.

GLAIS, L.; KERLAN, C.; TRIBODET, M.; MARIE-JEANNE, V.; ROBAGLIA, C.; ASTIER-MANIFASTIER, S. Molecular characterization of *Potato virus Y^N* isolates by PCR-RFLP. **European Journal Plant Pathology**, Netherlands, v. 102, n. 7, p. 655-662, 1996.

GLAIS, L.; TRIBODET, M.; KERLAN, C. Genomic variability in *Potato potyvirus Y (PVY)*: evidence that PVY^{NW} and PVY^{NTN} variants are single to multiple recombinants between PVY^O and PVY^N isolates. **Archives of Virology**, Viena, v. 147, n. 2, p. 363-378, 2002

GLAIS, L.; TRIBODET, M.; KERLAN, C. Specific detection of the PVY^N-W variant of *Potato virus Y*. **Journal of Virological Methods**, Amsterdam, v. 125, n. 2, p. 131-136, 2005.

HAWKES, J. G. Origins of cultivated potatoes and species relationships. In: BRADSHAW, J. E.; MACKAY, G. R. **Potato genetics**. Wallingford: CAB International, 1994. p. 3-42.

HOOKER, W. J. **Compendium of potato diseases**. Saint Paul: American Phytopathological Society, 1981. 125 p.

KERLAN, C. **Potato virus Y**. 2006. (Descriptions of plant viruses, 414). Disponível em: <<http://www.dpvweb.net/dpv/showdpv.php?dpvno=414>>. Acesso em: 25 fev. 2008.

KRAMER, M.; SILBERSCHMIDT, K. A “faixa das nervuras”, uma doença de vírus do fumo encontrada no Estado de São Paulo. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 11, p. 165-188, 1940.

LE ROMANCER, M.; KERLAN, C.; NEDELLEC, M. Biological characterisation of various geographical isolates of *Potato virus Y* inducing superficial necrosis on potato tubers. **Plant Pathology**, Oxford, v. 43, n. 1, p. 138-144, 1994.

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, n. 1, p. 104-111, 1997.

LIMA, M. L. R. Z. C.; HAMERSCHMIDT, I. Avaliação da sanidade de tubérculos semente de batata utilizados em plantios de batata-consumo em dois municípios do Estado do Paraná. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, 15., 1982, São Paulo, SP. **Anais...** São Paulo, SP: SBF, 1982. p. 549.

MARTON, L.; BUSO, J. A.; DUSI, A. N.; MELO, P. E. Degenerescência devido a viroses em cultivares de batata. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE OLERICULTURA, 23., 1993, Brasília, DF. **Resumos...** Brasília, DF: SOB, 1993. p. 82.

MCDONALD, J. G.; SINGH, R. P. Assessment of North American isolates of PVY^N for strains that induce tuber necrotic ring necrosis disease. **American Potato Journal**, Orono, v. 70, n.11, p. 827, 1993. Abstract.

MCDONALD, J. G.; SINGH, R. P. Host range, symptomology, and serology of isolates of *Potato virus Y* (PVY) that share properties with both the PVY^N and PVY^O strain groups. **American Potato Journal**, Orono, v. 73, n. 7, p. 309-315, 1996.

MELO, D. S. **Viabilidade da seleção de famílias de batata em gerações precoces**. 2007. 114 p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

MORAES, F. H. R. **Caracterização de isolados do vírus Y (*Potato virus Y - PVY*), provenientes de batata no Brasil**. 2003. 124 p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

MORAES, F. H. R.; FIGUEIRA, A. R.; SANTOS, R. C. Caracterização da nova estirpe necrótica do vírus Y da batata. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, 30., 1997, Poços de Caldas, MG. **Anais...** Poços de Caldas, MG: SBF, 1997. p. 339.

MORAES, F. H. R.; FIGUEIRA, A. R.; SANTOS, R. C. Estudo comparativo de algumas propriedades de cinco isolados do vírus Y da batata. **Summa Phytopathologica**, Jaboticabal, v. 25, n. 2, p. 117-125, 1999.

NEI, M.; GOJOBORI, T. Simple methods for estimating the numbers of synonymous and nonsynonymous nucleotide substitutions. **Molecular Biology and Evolution**, Oxford, v. 3, n. 5, p. 418-426, 1986.

NIE, X.; SINGH, R. P. Specific differentiation of recombinant PVY^{N:O} and PVY^{NTN} isolates by multiplex RT-PCR. **Journal of Virological Methods**, Amsterdam, v.113, n. 2, p. 69-77, 2003.

NÓBREGA, N. R.; SILBERSCHMIDT, K. Sobre uma provável variante do vírus "Y" da batatinha (*Solanum virus 2*, Orton) que tem a peculiaridade de provocar necroses em plantas de fumo. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 15, p. 307-330, 1944.

OGAWA, T.; TOMITAKA, Y.; NAKAGAWA, A.; OHSHIMA, K. Genetic structure of a population of *Potato virus Y* inducing potato tuber necrotic ringspot disease in Japan: comparison with North American and European populations. **Virus Research**, Paris, v. 131, n. 2, p. 199-212, 2008.

RIGOTTI, S.; GUGERLI, P.; Rapid identification of *Potato virus Y* strains by one-step triplex RT-PCR. **Journal of Virological Methods**, Amsterdam, v.140, n. 1/2, p.90-94, 2007.

SALAZAR, L. F.; BARTOLINI, I.; FLORES, V. Evidence for the existence of PVY^{NTN} in the Andes and a hypothesis towards its origin. **Fitopatología**, Lima, v. 35, n. 2, p. 87-90, 2000.

SCHUBERT, J.; FOMITCHEVA, V.; SZTANGRET-WISNIEWSKA, J. Differentiation of *Potato virus Y* strains using improved sets of diagnostic PCR-primers. **Journal of Virological Methods**, Amsterdam, v.140, n. 1-2, p. 66–74, 2007.

SERRA, M. C.; WEIDEMANN, H. L. First report of potato tuber-necrotic ringspot disease caused by PVY^{NTN} in Portugal. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 81, n. 6, p. 694, 1997. Abstract.

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

SILBERSCHMIDT, K. A degenerescência da batatinha. **O Biológico**, São Paulo, v. 3, n. 9, p. 247-254, 1937.

SINGH, R. P.; VALKONEN, J. P. T.; GRAY, S. M.; BOONHAM, N.; JONES, R. A. C.; KERLAN, C.; SCHUBERT, J. Discussion paper : The naming of *Potato virus Y* strains infecting potato. **Archives of Virology**, v. 153, p. 1-13, 2008.

SOUZA-DIAS, J. A. C. Raças do vírus Y da batata (PVY) e a questão da variante NTN. **Batata Show**, Itapetininga, v. 1, n. 2, p. 16-21, 2001.

SOUZA-DIAS, J. A. C.; BARROSO, P. A. V.; SILVA FILHO, H. M.; HAYASHI, P. C.; FO, A. P. O. Ocorrência de potyvirus associado a anéis necróticos superficiais em tubérculos de batata 'Atlantic': PVY^{NTN} no Brasil. In: CONGRESSO PAULISTA DE FITOPATOLOGIA, 21., 1998, Botucatu, SP. **Anais...** Botucatu, SP: SPF, 1998. p. 74.

SOUZA-DIAS, J. A. C.; SILVA FILHO, H. M.; GRANJA, N. P.; HAYASHI, P. C. Novas observações sobre a putativa raça NTN do vírus Y da batata (PVY^{NTN}), causadora de anéis necróticos superficiais nos tubérculos. In: CONGRESSO PAULISTA DE FITOPATOLOGIA, 22., 1999, Jaboticabal, SP. **Anais...** Jaboticabal, SP: SPF: 1999. p. 36.

SOUZA-DIAS, J. A. C.; TRISTÃO, F. J. Rise of PVY Incidence in seed potato regions of São Paulo State (Brazil) associated with the introduction of Atlantic potatoes. In: ANNUAL MEETING OF THE POTATO ASSOCIATION OF AMERICA, 81., 1997, Charlottetown, Prince Edw Is. **American Potato Journal**, Orono, v.74, p. 469, 1997. Abstract.

SOUZA-DIAS, J. A. C.; TRISTÃO, J. F.; MIRANDA, H. S. Vírus Y da batata-semente cv. Atlantic: alteração na epidemiologia da virose em São Paulo e Paraná. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 20, p. 320, 1995.

TOMASSOLI, L.; LUMIA, V.; CERATO, C.; GHEDINI, R. Occurrence of potato tuber necrotic ringspot disease (PTNRD) in Italy. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 82, n. 3, p. 350, 1998. Abstract.

TRUTA, A. A. C.; SOUZA, A. R. R.; NASCIMENTO, A. V. S.; PEREIRA, R. C.; PINTO, C. M. F.; BROMMONSCHENKEL, S. H.; CARVALHO, M. G.; ZERBINI, F. M. Identidade e propriedades de isolados de potyvírus provenientes de *Capsicum* spp. **Fitopatologia Brasileira**, Fortaleza, v. 29, n. 2, p. 160-168, 2004.

WEIDEMANN, H. L. Importance and control of *Potato virus Y^N* (PVY^N) in seed potato production. **Potato Research**, Wageningen, v. 31, n. 1, p. 85-94, 1988.

WEIDEMANN, H. L.; MAISS, E. Detection of the potato tuber necrosis ringspot strain of *Potato virus Y* (PVY^{NTN}) by reverse transcription and immunocapture polymerase chain reaction. **Journal of Plant Diseases and Protection**, Alemanha, v. 103, p. 337-345, 1996.

CAPÍTULO 3: Avaliação da disseminação do *Potato virus Y* (PVY) e de resíduos de inseticidas em tubérculos de batata, após o controle de vetores

RESUMO

Apesar de a batata ser suscetível a diversos vírus, o *Potato virus Y* (PVY) e o *Potato leafroll virus* (PLRV) são os que ocorrem em maior incidência no campo. A sua disseminação é realizada, principalmente, pelos afídeos. Entre eles, o mais importante é o *Myzus persicae*. Para controlar essa disseminação, são empregados inseticidas no sulco, por ocasião do plantio, e diversas vezes na parte aérea, durante o ciclo da cultura. Isso pode acarretar resíduos no solo, na água e nos tubérculos utilizados na alimentação, causando distúrbios indesejáveis na saúde humana. Visando investigar o efeito dos principais tratamentos empregados no controle desses afídeos vetores e na disseminação de vírus na cultura da batata, bem como a possibilidade de deixarem resíduos indesejáveis nos tubérculos destinados à alimentação, este experimento foi realizado no campo experimental do Departamento de Biologia/UFLA. Empregaram-se duas combinações de granulados no sulco de plantio com quatro inseticidas foliares assim distribuídas em 11 tratamentos: T₁ Thiamethoxam + Methamidophos; T₂ Thiamethoxam + Imidacloprid; T₃ Thiamethoxam + Parathion Methyl; T₄ Thiamethoxam + Thiamethoxam; T₅ Somente Thiamethoxam no sulco; T₆ Phorate + Methamidophos; T₇ Phorate + Imidacloprid; T₈ Phorate + Parathion Methyl; T₉ Phorate + Thiamethoxam; T₁₀ Somente Phorate no sulco e T₁₁ Controle. A incidência inicial e final de vírus nos tubérculos foram determinadas por DAS-ELISA e a análise de resíduos foi feita no Laboratório de Análises de Resíduos do Departamento de Entomologia (DEN) da UFLA. A produção média por parcela variou de 24,91 kg/parcela (25,95 t/ha) no tratamento T₆ a 32,73 kg/parcela (34,08t/ha) no tratamento T₂. Esses tratamentos apresentaram também o menor e o maior número de tubérculos, respectivamente, mas foi o tratamento T₄ que apresentou a maior porcentagem de tubérculos comercializáveis (71,94%), pertencentes às classes I a III. Apesar dessa tendência em apresentar pequenas diferenças entre os tratamentos, essas não foram estatisticamente representativas. A incidência de PVY, que no início da cultura era de 28,5%, no final apresentou números médios que variaram entre 39,8% e 60,4%. De modo geral, observou-se que os tratamentos inseticidas empregados não impediram a disseminação do vírus no campo, provavelmente devido à alta incidência inicial do vírus e ao seu modo de transmissão pelo vetor, que é do tipo não persistente ou estiletar. Isso evidencia a importância do uso de sementes sadias. Os níveis de resíduos de inseticidas, em todos os tratamentos empregados, se mantiveram dentro do limite permitido pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), mostrando que, se os mesmos forem aplicados conforme a recomendação, não existe risco para a

saúde humana. Provavelmente, a presença de resíduos em tubérculos somente ocorre quando as concentrações do princípio ativo empregadas pelo agricultor estão acima das recomendadas pelo fabricante.

ABSTRACT

Even being susceptible to different viruses, the most important viruses in potato fields are the *Potato virus Y* (PVY) and *Potato leafroll virus* (PLRV), because they are found in high incidences. Their spread is performed by several aphid species, but the most important seems to be the *Myzus persicae*. The measures to control the potato viruses spread in field by the vector include the use of soil treatment with insecticides, followed by several leaves spraying with different products. It can leave residue in the soil, in the water and in the produced tubers, which has been considered too risky for human and animal health. Aiming to investigate the effect of the routine insecticide treatments, which are recommended by insecticide traders and have been used by potato growers, one experiment was carried out at the experimental field of UFLA. It was accomplished with eleven treatments and four replicates, employing two combinations of soil treatment with four insecticides to leaf sprayings as follow: T₁=Thiamethoxam + Methamidophos ; T₂ = Thiamethoxam + Imidacloprid; T₃ = Thiamethoxam + Parathion Methyl; T₄ = Thiamethoxam + Thiamethoxam; T₅ = Only soil treatment with Thiamethoxam; T₆ = Phorate + Methamidophos; T₇ = Phorate + Imidacloprid ; T₈ = Phorate + Parathion Methyl; T₉ = Phorate + Thiamethoxam; T₁₀ Only soil treatment with Phorate; T₁₁ = Control, with no insecticide. The initial and final incidence of virus in the tubers was determined by DAS-ELISA and the residue analysis was done in the Residue Analysis Laboratory of the Entomology Department (DEN) at UFLA. The average production per parcel ranged from 24.91 kg/plot (25.95 ton/ha) in the treatment T6 to 32.73 kg/plot (34.08ton/ha) in the treatment T2. Those treatments presented also the lowest and the highest number of tubers, respectively, but only in the treatment T4 the greatest percentage of tubers proper for commercialization (71.94%) was observed, belonging to classes I to III. However, even showing a tendency to present small differences among the treatment yields, there was no statistical difference. The incidence of PVY, which at the beginning of harvest was of 28.5%, increased to 39.8% and to 60.4% in the harvested potato tubers. In general, it was found that the insecticide treatments employed did not prevent the spread of the virus in the field, probably because of the high virus incidence in potato seeds and because of the mechanism of virus spread which is non persistent. That demonstrates the importance of using healthy seeds. The levels of insecticides residue in every tested insecticide treatment, was smaller than those allowed by ANVISA (National Agency of Sanitary Surveillance), showing that products and concentration recommended by manufactures are quite safe for human and animal health. Therefore, the presence of higher levels of insecticides residue on

potato tubers probably will occur only if potato growers do not follow the supplier's prescriptions.

1 INTRODUÇÃO

A batata (*Solanum tuberosum* L.) é considerada, em termos mundiais, a terceira fonte alimentar da humanidade, suplantada pelo arroz, trigo e seguida pelo milho (Fontes, 2005). O Brasil ocupa a 17ª posição no ranking mundial de países produtores de batata, e as regiões Sul e Sudeste (PR, RS, SC, MG, SP e ES) são responsáveis por mais de 86% dessa produção (Agrianual, 2008; FAO, 2008). Minas Gerais ocupa a destacada posição de maior estado produtor de batata, desde 1997, com um volume produzido, em 2007, de mais de um milhão de toneladas (Agrianual, 2008).

A batateira é susceptível a muitas doenças bióticas, de modo que, até o momento, cerca de 70 delas, incluindo mais de 20 de origem viróticas, já foram relatadas (Hooker, 1981; Beemster & De Bokx, 1987; Figueira, 1999). No Brasil e na maior parte dos países onde se cultiva a batata, os principais vírus encontrados têm sido o *Potato virus Y* (PVY), o *Potato leafroll virus* (PLRV), o *Potato virus X* (PVX) e o *Potato virus S* (PVS). Esses são os responsáveis pela maioria das perdas observadas no campo e estão diretamente ligados à degenerescência dos tubérculos semente (Salas, 2004).

Embora o PVX e o PVS não sejam frequentemente transmitidos por vetores, o PLRV e o PVY são transmitidos de modo bastante eficiente por afídeos vetores diversos, dentre os quais o *Myzus persicae* ocupa lugar de destaque (Costa et al., 1960; De Bokx & Huttinga, 1981; Souza-Dias, 1996; Figueira, 1999; Salles, 2002). Como as viroses não apresentam controle curativo, este deve ser feito principalmente por meio de medidas preventivas, como o uso de cultivares resistentes e o controle da disseminação do vírus por meio do controle do vetor, utilizando inseticidas. Existem diversos produtos no mercado capazes de atuar na eliminação do vetor, porém, o seu uso irracional

tem sido questionado, pois, dependendo da dosagem e do período de aplicação, pode deixar resíduos tóxicos extremamente prejudiciais à saúde do consumidor.

Embora o uso desses produtos para a proteção das plantas seja de grande valia, pois, direta ou indiretamente, concorrem decisivamente para o aumento da produção, a procura por segurança alimentar tem estimulado estudos sobre o risco de se consumir alimentos contaminados por agroquímicos. Rigitano (1982a) chama a atenção para o fato de que o uso de agroquímicos contribui para o incremento da produção agrícola, mas também pode acarretar persistência de resíduos tóxicos nas partes tratadas, cujo consumo, mesmo em pequenas doses, representa grave risco à saúde do consumidor. A estabilidade de certos agroquímicos e o fato de que resíduos podem continuar no alimento podem acentuar esse risco.

Neste trabalho foram empregadas dez tratamentos com inseticidas, na dosagem e no intervalo de aplicação utilizado pelo bataticultor, acrescido de um tratamento testemunha sem inseticida, com a finalidade de verificar o seu efeito na disseminação do PVY e a possibilidade de deixarem resíduos acima do limite permitido pela ANVISA nos tubérculos de batata destinados ao consumo.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Modelo e local do experimento

O experimento foi realizado no período de setembro de 2007 a janeiro de 2008, no campo experimental do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras (UFLA), em uma área rica em matéria orgânica, proveniente da decomposição de palhada de milho. O local fica a 910 m de altitude, 21°16' S de latitude e 44°58' W de longitude.

O delineamento experimental utilizado foi em blocos casualizados em esquema fatorial $2 \times 5 + 1$, com 11 tratamentos e 4 repetições. As parcelas foram constituídas de 40 plantas da cv. Ágata, distribuídas em duas linhas com espaçamento de 0,30 m entre plantas e 0,80m entre linhas. As incidências do PVY, PLRV, PVS e PVX, nos tubérculos empregados e nos tubérculos colhidos, foram determinadas por DAS-ELISA, empregando-se anti-soros policlonais. Os tratamentos empregados constaram de uma aplicação de Thiamethoxam ou Phorate granulado no sulco, combinados com inseticidas foliares como segue: T₁ = Thiamethoxam granulado no sulco + Methamidophos; T₂ = Thiamethoxam granulado no sulco + Imidacloprid; T₃ = Thiamethoxam granulado no sulco + Parathion Methyl; T₄ = Thiamethoxam granulado aplicado no sulco de plantio + Thiamethoxam granulado dispersível aplicado via foliar; T₅ = somente Thiamethoxam granulado no sulco; T₆ = Phorate + Methamidophos; T₇ = Phorate + Imidacloprid; T₈ = Phorate + Parathion Methyl; T₉ = Phorate + Thiamethoxam granulado dispersível; T₁₀ = somente Phorate no sulco; T₁₁ = controle, sem tratamento inseticida. As aplicações no sulco foram feitas imediatamente antes do plantio dos tubérculos, enquanto as pulverizações foram realizadas em intervalos de 7 a 9 dias, dependendo das condições ambientais, como ocorrência ou não de chuva. Na maioria das aplicações foi adotado o intervalo de 7 dias

entre aplicações, para repetir a metodologia empregada pelo bataticultor em campos comerciais de produção.

A adubação de plantio foi feita com a formulação de NPK 4-14-8 (N, P₂O₅ e K₂O) na dosagem de 3,0 t/ha. Cerca de 50 dias após o plantio, realizou-se a adubação de cobertura, empregando-se 300 kg/ha de sulfato de amônio seguida da operação de amontoa. O manejo das fitodoenças seguiu o recomendado para a cultura e o sistema de irrigação foi por aspersão, geralmente irrigando o experimento duas vezes por semana, na ausência de chuva, dependendo, portanto, das condições de umidade do solo. Os dados de precipitação pluviométrica, insolação, temperatura e umidade relativa no período da pesquisa, encontram-se nas Figuras 1, 2, 3 e 4.

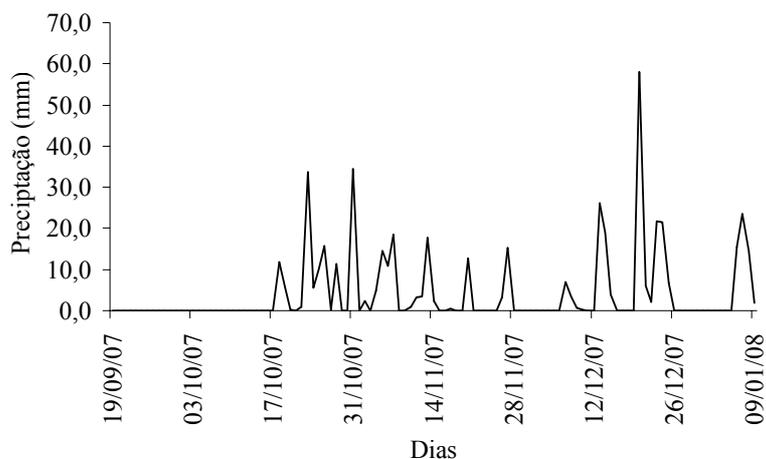


FIGURA 1 Precipitação (mm) pluviométrica no período de condução do experimento no campo. Dados obtidos da Estação Meteorológica da Universidade Federal de Lavras. Lavras, MG, 2008.

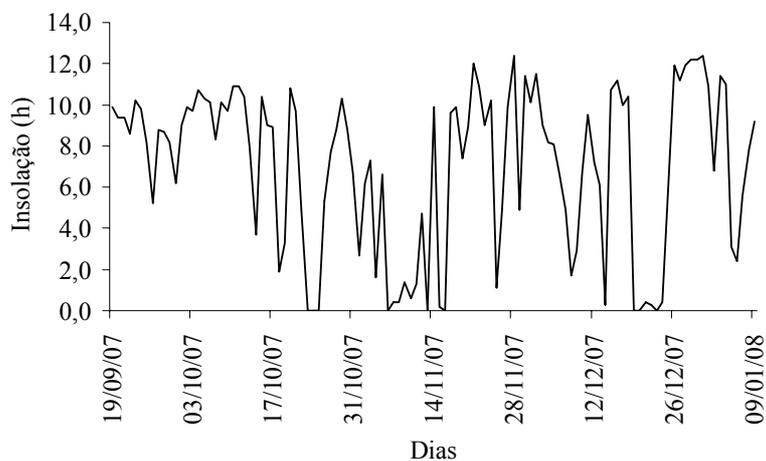


FIGURA 2 Insolação (h) no período de condução do experimento no campo. Dados obtidos da Estação Meteorológica da Universidade Federal de Lavras. Lavras, MG, 2008.

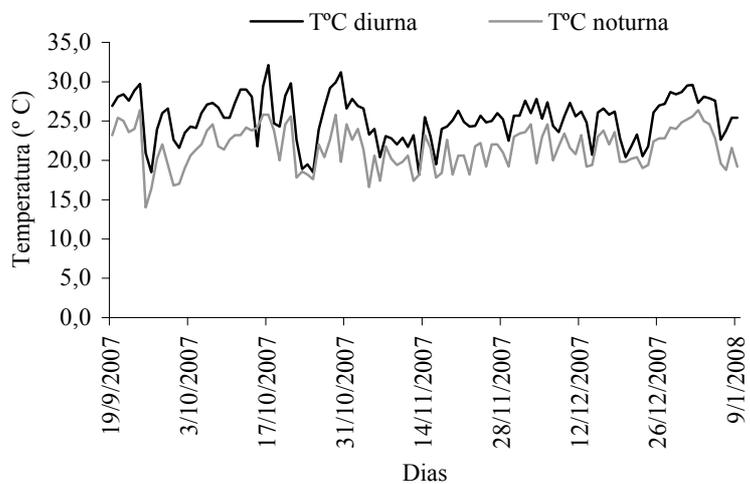


FIGURA 3 Temperatura (°C) diurna e noturna no período de condução do experimento no campo. Dados obtidos da Estação Meteorológica da Universidade Federal de Lavras. Lavras, MG, 2008.

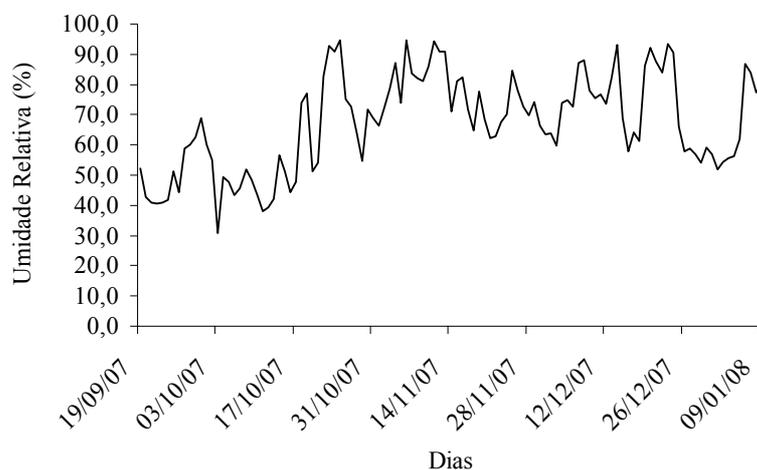


FIGURA 4 Umidade relativa (UR%) no período de condução do experimento no campo. Dados obtidos da Estação Meteorológica da Universidade Federal de Lavras. Lavras, MG, 2008.

2.2 Avaliação da produção

Antes da colheita, um tubérculo de cada planta de todas as parcelas foi coletado e encaminhado para o laboratório para análise virológica. A colheita foi feita manualmente, aos 100 dias após o plantio, e os tubérculos foram classificados por tamanho, utilizando-se o seguinte critério: tipo I) ≥ 61 mm; tipo II) $\geq 51 \leq 60$ mm; tipo III) $\geq 41 \leq 50$ mm; tipo IV) $\geq 31 \leq 40$ mm e tipo V) $\geq 21 \leq 30$ mm. Após a separação por tamanho, os tubérculos foram contados e pesados por tipo. Foram considerados também o número, o peso e a classificação dos tubérculos encaminhados para análise de vírus e para análises de resíduos no Laboratório de Toxicologia da UFLA.

2.3 Procedimentos laboratoriais

2.3.1 DAS-ELISA

O teste DAS-ELISA (Clark & Adams, 1977) foi empregado para diagnosticar PVY, PVX, PVS e PLRV. Foram utilizados os anticorpos policlonais da Bioreba e o procedimento empregado foi o recomendado pelo fabricante. A leitura das placas foi feita a 405 nm, no espectrofotômetro da Dinotech, tendo sido consideradas positivas as amostras que apresentaram absorvância igual ou maior a duas vezes a absorvância do controle sadio.

2.3.2 Análise de resíduos

Os métodos analíticos utilizados na análise de resíduos foram baseados naqueles disponibilizados pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (United States Environmental Protection Agency, 2007)*. As subamostras de 100g de batata foram submetidas à extração dos resíduos em liquidificador, utilizando-se acetona como solvente extrator. Os extratos foram purificados por meio de partição líquido-líquido e, no caso do Phorate, os extratos foram posteriormente submetidos à oxidação com permanganato de sódio, para análise conjunta do Phorate e seus produtos de oxidação tóxicos. Nos casos em que uma purificação mais apurada dos extratos foi necessária, essa foi feita por cromatografia de camada delgada em sílica gel. A quantificação dos resíduos foi feita em sistema de cromatografia líquida de alta eficiência, com detector de ultravioleta, nos casos de Thiamethoxam e Imidacloprid, ou em sistema de cromatografia gás-líquido, com detector de nitrogênio e fósforo, para os demais compostos. A avaliação da comparação de resíduos foi feita utilizando-se parâmetros estipulados pela ANVISA (Tabela 1).

TABELA 1 Limite máximo de resíduo em batata permitido pela ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2008).

Produtos	Limite de resíduo permitido (mg/kg)*
Actara-Thiamethoxam	0,02
Granutox-Phorate	0,05
Stron-Methamidophos	0,10
Folidol-Parathion Methyl	0,10
Confidor-Imidacloprid	0,50

*Miligrama de resíduo por quilo de batata analisada.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Avaliação da produção

As produções médias das plantas de batata submetidas aos diversos tratamentos, em kg/parcela e em t/ha, estão discriminadas nas Tabelas 2 e 3, respectivamente. Elas variaram de 24,91 kg/parcela e 25,95 t/ha, no tratamento 6 (Phorate + Methamidophos) a 32,73 kg/parcela e 34,08 t/ha, no tratamento 2 (Thiamethoxam granulado no sulco + Imidacloprid).

Considerando-se o tamanho dos tubérculos, observou-se que a menor produção de tubérculos graúdos foi obtida pelas parcelas submetidas aos tratamentos 6 (Phorate + Methamidophos), 7 (Phorate + Imidacloprid) e 10 (somente Phorate no sulco). Por outro lado, os tratamentos 2 e 5 (somente Thiamethoxam granulado no sulco) foram os que propiciaram a maior produção de tubérculos graúdos. Também na Tabela 3 podem-se observar as incidências finais de PVY nas parcelas.

As menores incidências finais de vírus foram observadas nas parcelas submetidas aos tratamentos 9 (Phorate + Thiamethoxam granulado dispersível) e 10. Entretanto, não se notou correspondência entre essa incidência mais baixa e alta produtividade. Pelo contrário, as plantas submetidas ao tratamento 7, que tiveram a incidência mais alta (60,40%), apresentaram produção ligeiramente maior que as submetidas ao tratamento 10, com incidência de 39,8%. Isso poderia ser explicado pela época em que a planta deve ter sido infectada, ou seja, plantas infectadas no final do ciclo, apesar de apresentarem tubérculos infectados, não apresentam perdas significativas, pois as perdas são tanto maiores quando mais jovens essas forem infectadas (De Bokx & Huttinga, 1981; Beemster & De Bokx, 1987). Se as plantas das parcelas com menor incidência de vírus tiverem sido infectadas mais no início do ciclo, elas podem apresentar maiores perdas.

Os tratamentos, de modo geral, não impediram a disseminação do PVY no campo. Provavelmente, isso ocorreu porque as sementes estavam com uma alta incidência desse vírus e por causa do seu tipo de transmissão pelo vetor, que é do tipo não persistente ou estiletar. Isso significa que, como o vírus pode ser transmitido na picada de prova, antes de ser eliminado pelo inseticida, o vetor tem a oportunidade de picar mais de uma planta, disseminando o vírus dentro da cultura. O controle químico pode se tornar mais eficiente quando o vírus é transmitido de forma persistente. Groves et al. (2001), utilizando o imidacloprid, conseguiu reduzir a incidência do *Tomato spotted wilt tospovirus*, tanto no campo (para tomate e pimenta) como em casa de vegetação (pimenta, tomate e fumo). Resultado parecido foi obtido, por Boiteau & Singh (1999), para o (PLRV), utilizando também o imidacloprid na cultura da batata.

Nas Tabelas 4 e 5 estão discriminados o número médio e o peso médio de tubérculos, em gramas (g) por classe de I a V. Com relação à porcentagem de tubérculos comercializáveis, classificados de I a III, o tratamento 4 (Thiamethoxam granulado no sulco + Thiamethoxam granulado dispersível) foi o que teve a maior porcentagem de tubérculos comercializáveis: 71,94%, enquanto o 9 teve a menor (60,82%). Considerando-se que as parcelas submetidas ao tratamento 9 foram uma das que tiveram um menor índice final de vírus, este é mais um dado indicando que a infecção nessas parcelas pode ter acontecido no início do ciclo.

TABELA 2 Peso médio (kg) de tubérculos de batata nas classes de I a V, submetidas a diferentes tratamentos químicos, para o controle de vetores do *Potato virus Y*. Lavras, MG, 2008.

Tratamentos	Distribuição da produção das parcelas (kg) por classe de tubérculos					Produção total kg/parcela
	Classe I ≥61 mm	Classe II ≥51≤60mm	Classe III ≥41≤50mm	Classe IV ≥31≤40 mm	Classe V ≥21≤30mm	
1	12,08 a	8,33 a	4,44 a	1,26 a	0,47 ab	26,58 a
2	14,34 a	9,71 a	5,80 ab	2,21 abc	0,67 b	32,73 a
3	12,24 a	10,64 a	5,39 ab	1,67 ab	0,56 ab	30,50 a
4	14,28 a	9,80 a	6,03 b	1,63 ab	0,48 ab	32,22 a
5	14,05 a	9,60 a	5,17 ab	1,89 abc	0,54 ab	31,25 a
6	8,30 a	9,52 a	5,25 ab	1,44 ab	0,40 ab	24,91 a
7	8,76 a	10,61 a	5,50 ab	2,51 bc	0,49 ab	27,87 a
8	12,32 a	9,72 a	4,79 ab	1,60 ab	0,53 ab	28,96 a
9	12,27 a	8,83 a	5,31 ab	2,96 c	0,50 ab	29,87 a
10	9,97 a	9,75 a	4,74 ab	1,60 ab	0,38 a	26,44 a
11	13,43 a	8,76 a	5,24 ab	1,97 abc	0,44 ab	29,84 a

*Médias com a mesma letra não diferem estatisticamente entre si, a 5% de probabilidade, pelo teste Tukey.

TABELA 3 Produção média de tubérculos de batata, submetidas a diferentes tratamentos, em toneladas por hectare (t/ha), distribuída por classe de tubérculos e produção média total. Lavras, MG, 2008.

Tratamentos (T) e incidência final de PVY* (%)		Distribuição da produção média (tonelada/ha) nas classes indicadas					Produção total (t.ha ⁻¹)
		Classe I ≥61 mm	Classe II ≥51≤60mm	Classe III ≥41≤50mm	Classe IV ≥31≤40 mm	Classe V ≥21≤30mm	
T	%						
1	43,10	12,58 a	8,68 a	4,62 a	1,31 a	0,49 ab	27,68 a
2	57,60	14,93 a	10,11 a	6,04 ab	2,30 bc	0,70 b	34,08 a
3	52,40	12,75 a	11,08 a	5,62 ab	1,74 ab	0,59 ab	31,78 a
4	51,40	14,88 a	10,20 a	6,28 b	1,70 ab	0,50 ab	33,56 a
5	57,50	14,63 a	10,0 a	5,39 ab	1,97 abc	0,56 ab	32,55 a
6	53,10	8,64 a	9,92 a	5,47 ab	1,50 ab	0,42 ab	25,95 a
7	60,40	9,12 a	11,05 a	5,73 ab	2,61 bc	0,51 ab	29,03 a
8	44,30	12,84 a	10,13 a	4,99 ab	1,66 ab	0,55 ab	30,17 a
9	40,60	12,79 a	9,20 a	5,53 ab	3,08 c	0,51 ab	31,11 a
10	39,80	10,38 a	10,15 a	4,94 ab	1,67 ab	0,40 a	27,54 a
11	43,10	13,99 a	9,12 a	5,46 ab	2,05 abc	0,46 ab	31,08 a

* A incidência inicial de PVY nos tubérculos empregados como sementes foi de 28,5%.

* Médias com a mesma letra não diferem estatisticamente entre si, a 5% de probabilidade, pelo teste Tukey.

Conforme pode ser observado, nas condições desse experimento, houve uma tendência de as parcelas tratadas com Thiamethoxam produzirem melhor do que as tratadas com Phorate. Costa et al. (1972), empregando Phorate-5 para controlar a disseminação viral em condições de campo, observaram, contrariamente, que esse produto induziu um grande acréscimo de produção. Como nas condições desse experimento as sementes apresentaram alto índice inicial de PVY, isso pode ter influenciado de modo desfavorável na performance das plantas. Por outro lado, Pereira et al. (2007) verificaram que, quando o Thiamethoxam foi aplicado no sulco de plantio, provocou um alongamento nas raízes 63% maior que o observado nas plantas controle. Isso pode explicar o melhor desempenho das plantas tratadas com esse produto.

A literatura relata produções maiores do que as que foram obtidas neste trabalho. Porém, a época e o local de plantio desse experimento apresentaram condições desfavoráveis à cultura. De acordo com Antunes & Fortes (1981), o clima é um fator limitante na produção da batateira, e as condições ideais incluem temperaturas noturnas entre 10°C e 20°C. Altas temperaturas reduzem o crescimento da planta e a partição de assimilados aos tubérculos (Fontes & Finger, 1999). As temperaturas durante o período do experimento podem ser observadas na Figura 3.

TABELA 4 Número médio de tubérculos, nas classes de I a V, número médio total de tubérculos e porcentagem de tubérculos comercializáveis produzidos pelas parcelas submetidas a diferentes tratamentos. Lavras, MG, 2008.

Tratamentos	Distribuição dos tubérculos produzidos pelas parcelas nas classes indicadas					Número Médio de tubérculos produzidos/tratamento	% de tubérculos comercializáveis (I a III)
	Classe I ≥61 mm	Classe II ≥51≤60mm	Classe III ≥41≤50mm	Classe IV ≥31≤40 mm	Classe V ≥21≤30mm		
1	52,75 ab	75,75 a	69,25 ab	40,00 a	60,00 a	297,75	66,41
2	74,50 b	87,50 a	89,50 b	65,00 abc	69,00 a	385,50	65,23
3	58,25 ab	89,00 a	78,00 ab	44,75 ab	57,25 a	327,25	68,83
4	64,50 ab	82,50 a	88,25 b	48,00 abc	43,75 a	327,00	71,94
5	63,75 ab	80,50 a	70,75 ab	57,75 abc	49,25 a	322,00	66,93
6	41,25 a	82,25 a	69,50 ab	41,75 a	49,00 a	283,75	68,01
7	43,50 a	94,00 a	89,00 b	78,75 c	50,25 a	355,50	63,71
8	58,00 ab	82,00 a	75,25 ab	61,00 abc	62,25 a	338,50	63,59
9	62,00 ab	78,75 a	81,25 ab	76,25 bc	66,75 a	365,00	60,82
10	48,25 ab	84,00 a	65,75 a	45,25 abc	44,25 a	287,50	68,87
11	64,25 ab	78,25 a	86,75 b	62,00 abc	61,75 a	353,00	64,85

*Médias com a mesma letra não diferem estatisticamente entre si, a 5% de probabilidade, pelo teste Tukey

TABELA 5 Peso médio dos tubérculos de batata, em gramas (g), das classes I a V, produzidos por plantas submetidas aos onze tratamentos para o controle de afídeos vetores do *Potato virus Y*. Lavras, MG, 2008.

Tratamentos	Peso médio (g) apresentado pelos tubérculo nas classes indicadas				
	Classe I ≥61 mm	Classe II ≥51≤60mm	Classe III ≥41≤50mm	Classe IV ≥31≤40 mm	Classe V ≥21≤30mm
1	230 a	110 a	60 ab	30 b	8 a
2	200 a	110 a	70 ab	30 b	10 abc
3	210 a	120 a	70 ab	40 b	10 bc
4	220 a	120 a	70 ab	30 b	11 bc
5	220 a	120 a	70 ab	30 b	12 c
6	200 a	120 a	80 b	30 b	9 abc
7	200 a	110 a	60 ab	30 ab	10 abc
8	210 a	120 a	60 ab	30 a	8 ab
9	200 a	110 a	70 ab	40 b	8 a
10	210 a	120 a	70 ab	40 b	9 abc
11	200 a	110 a	60 a	30 b	7 a

*Médias com a mesma letra não diferem estatisticamente entre si, a 5% de probabilidade, pelo teste Tukey

3.2 Avaliação dos níveis de resíduo

Os resultados dos níveis de resíduo nos tubérculos das plantas submetidas aos diferentes tratamentos podem ser observados na Tabela 6. Notam-se dois comportamentos: o primeiro referentes a produtos que foram aplicados via foliar, que normalmente apresentaram um nível tão baixo de resíduo abaixo do mínimo detectável, indicando que esses produtos são altamente seguros do ponto de vista toxicológico.

TABELA 6 Resultado da análise de resíduos de inseticidas em tubérculos de batata submetidas aos diferentes tratamentos, fornecidos pelo Laboratório de Toxicologia, no Departamento de Entomologia da Universidade Federal de Lavras. Lavras, MG, 2008.

Tratamentos	Formas de aplicação	Ingrediente ativo	Repetições (resíduos em mg de i.a./kg de batata) ^a			
			A	B	C	D
I	Sulco	Thiamethoxam	n.d. ^b	0,002	0,002	n.d.
	Foliar	Methamidophos	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
II	Sulco	Thiamethoxam	0,003	0,002	n.d.	0,002
	Foliar	Imidacloprid	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
III	Sulco	Thiamethoxam	n.d.	n.d.	0,002	n.d.
	Foliar	Parathion Methyl	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
IV	Sulco/Foliar	Thiamethoxam	0,002	0,003	n.d.	0,002
V	Sulco	Thiamethoxam	n.d.	0,003	0,004	0,002
VI	Sulco	Phorate	0,002	0,006	0,003	0,003
	Foliar	Methamidophos	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
VII	Sulco	Phorate	0,004	0,005	0,003	0,002
	Foliar	Imidacloprid	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
VIII	Sulco	Phorate	0,005	0,004	0,007	0,003
	Foliar	Parathion Methyl	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
IX	Sulco	Phorate	0,004	0,006	0,004	0,004
	Foliar	Thiamethoxam	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
X	Sulco	Phorate	0,003	0,005	0,006	0,004
XI	Testemunha	Sem Tratamento	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

^a No caso do phorate, os valores se referem à soma de phorate e seus produtos de oxidação tóxicos. ^b n.d. = não detectável (limites mínimos de quantificação iguais a 0,002 .mg/kg, para todos os compostos).

Por outro lado, quando se comparam os níveis de resíduo de produtos aplicados no sulco, nota-se que os tubérculos das plantas tratadas com Thiamethoxam no sulco apresentaram um nível de resíduo um pouco acima do mínimo detectável, na ordem de 0,002 mg/kg, enquanto que os das tratadas com Phorate apresentaram um nível maior, chegando a 0,007 mg/kg. Porém, todos esses valores se encontram abaixo da quantidade máxima permitida pela ANVISA (Tabela 1). Caldas et al. (2004) trabalhando com níveis de fungicidas do grupo dos Dithiocarbamates para várias culturas, não encontraram níveis de resíduos acima do limite máximo permitido para diversas espécies, inclusive para a cultura da batata.

Resultados diferentes foram encontrados por Daraghmeh et al. (2007) que verificaram resíduos de imidacloprid acima do permitido em várias culturas, entre elas, a batateira.

Rigitano (1982b) utilizou três tratamentos com phorate, o primeiro seguindo as recomendações do fabricante, o segundo usando o dobro da dose indicada pelo fabricante e aplicada exclusivamente no sulco de plantio e o terceiro tratamento utilizando o dobro da dose recomendada pelo fabricante. O último tratamento foi feito de forma parcelada, com metade aplicada no sulco na ocasião do plantio e o restante na amontoa. Quando o autor usou a dose mais alta, independentemente de ter sido aplicado de forma parcelada ou não, foi possível detectar resíduo nos tubérculos de batata, acima do limite estabelecido por Cavero et al., 1976.

4 CONCLUSÕES

1. As plantas de batata submetidas aos tratamentos com o Thiamethoxam apresentaram, de modo geral, maior produção, maior número de tubérculos e, conseqüentemente, maior produtividade quando comparadas àquelas tratadas com Phorate.
2. Os tratamentos com inseticidas não impediram a disseminação do PVY no campo, mostrando a importância de se empregar sementes livres de vírus.
3. Os resíduos encontrados nos tubérculos provenientes das plantas submetidas aos diferentes tratamentos ficaram abaixo do limite permitido pela ANVISA, mostrando que, se as dosagens recomendadas de inseticidas forem respeitadas, não existe risco para o consumidor.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Agrotóxicos e toxicologia**. Disponível em:
<<http://www.anvisa.gov.br/toxicologia/monografias/index.htm>>. Acesso em: 10 abr. 2008.
- AGRIANUAL. **Anuário da agricultura brasileira**. São Paulo: FNP Consultoria, 2008. 502 p.
- ANTUNES, F. Z.; FORTES, M. Exigências climáticas da cultura da batata. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 7, n. 76, p. 19-23, 1981.
- BEEMSTER, A. B. R.; DE BOKX, J. A. Survey of properties and symptoms. In: DE BOKX, J. A.; WANT, J. P. H. van der (Ed.). **Viruses of potato and seed potato production**. 2. ed. Wageningen: PUDOC, 1987. p. 84-113.
- BOITEAU, G.; SINGH, R. P. Field assessment of imidacloprid to reduce the spread of PVY^O and PLRV in potato. **American Journal Potato Research**, New York, v. 76, n. 1, p. 31-36, 1999.
- DE BOKX, J. A.; HUTTINGA, H. **Potato virus Y**. Kew: Commonwealth Mycological Institute/Association of Applied Biologists, 1981. 6 p. (Descriptions of plant viruses, 242).
- CALDAS, E. D.; MIRANDA, M. C. C.; CONCEIÇÃO, M. H.; SOUZA, L. C. K. R. Dithiocarbamates residues in Brazilian food and the potencial risk for consumers. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 42, n. 11, p. 1877-1883, 2004.
- CAVERO, E.S; GUERRA, M.S; SILVEIRA, C.P.D. **Manual de inseticidas e acaricidas**, Pelotas, Aimara, 1976. 345p.
- CLARK, M. F.; ADAMS, A. N. Characteristics of the microplate method of enzyme linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. **Journal of General Virology**, Great Britain, v. 34, n. 3, p. 475-483, 1977.
- COSTA, A. S.; CARVALHO, A. M. B.; KITAJIMA, E. W. Risca do tomateiro em São Paulo causada por estirpe do vírus Y. **Bragantia**, Campinas, v. 19, n. 67, p. 1111-1128, 1960.

COSTA, C. L.; COSTA, A. S.; NAGAI, H. Granutox aumenta três vezes a produção de tomate. **Boletim do Campo**, Rio de Janeiro, v. 35, n. 3, p. 17-21, 1972.

DARAGHMEH, A.; SHRAIM, A.; ABULHAJ, S.; SANSOUN, R.; JACK, C. N. G. Imidacloprid residues in fruits, vegetables and water samples from Palestine. **Environmental Geochemistry Health**, Netherlands, v. 29, n. 1, p. 45-50, 2007.

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

FONTES, P. C. R. Cultura da batata. In: _____. **Olericultura: teoria e prática**. Viçosa, MG: UFV, 2005. p. 323-343.

FONTES, P. C. R.; FINGER, F. L. Dormência dos tubérculos, crescimento da parte aérea e tuberização da batateira. **Informe agropecuário**, Belo Horizonte, v. 20, n. 197, p. 24-29, 1999.

FOOD AGRICULTURE ORGANIZATION. **Estatísticas agrícolas**. Disponível em: <<http://www.fao.org/>>. Acesso em: 20 jun. 2008.

GROVES, R. L.; SORENSON, C. E.; WALGENBACH, J. F.; KENNEDY, G. G. Effects of imidacloprid on transmission of tomato spotted wilt tospovirus to pepper, tomato and tobacco by *Frankliniella fusca* Hinds (Thysanoptera: Thripidae). **Crop Protection**, Saint Paul, v. 20, n. 5, p. 439-445, 2001.

HOOVER, W. J. **Compendium of potato diseases**. Saint Paul: American Phytopathological Society, 1981. 125 p.

PEREIRA, M. A.; SILVA, F. M. L.; DUARTE, R. M.; CASTRO, P. R. C. Efeito do thiamethoxam e fludioxonil no comprimento das raízes da batata. In: ENCONTRO NACIONAL DE PRODUÇÃO E ABASTECIMENTO DE BATATA, 13., 2007, Holambra, SP. **Resumos...** Holambra: ABBA, 2007. Disponível em: <http://www.abbabatatabrasileira.com.br/images/eventos/arquivos/resumo_20.pdf>. Acesso em: 10 dez. 2007.

RIGITANO, R. L. O. Persistência de resíduos de methyl parathion e quinalphos em frutos de tomate (*Lycopersicon esculentum*). **Ciência e Prática**, Lavras, v. 6, n. 1, p. 63-70, 1982a.

RIGITANO, R. L. O. Resíduos de phorate e seus principais metabólitos em tubérculos de batatinha (*Solanum tuberosum* L.). **Ciência e Prática**, Lavras, v. 6, n. 2, p. 151-158, 1982b.

SALAS, F. J. S. **Comportamento de *Myzus persicae* (SULZER) (HEMIPTERA: APHIDIDAE) e transmissão de estirpes de *Potato virus Y* em diferentes cultivares de batata**. 2004. 122 p. Tese (Doutorado em Entomologia Agrícola) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, SP.

SALLES, L. A. B. As pragas da batata. **Cultivar, Hortaliças e Frutas**, Piracicaba, v. 2, n. 15, p. 16-28, 2002.

SOUZA-DIAS, J. A. C. Doenças causadas por vírus em batata. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 18, n. 184, p. 54-63, 1996.

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **Pesticides: analytical methods & procedures**. Disponível em: <<http://www.epa.gov/oppbeadt/methods.ramta.htm>>. Acesso em: 15 dez. 2007.