

**CONTROLE DA DISSEMINAÇÃO DE  
VÍRUS POR MEIO DE VETORES NA  
CULTURA DA BATATA E  
CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE  
TRÊS ISOLADOS ATÍPICOS DE *POTATO  
VIRUS Y (PVY)***

**REJANE RODRIGUES DA COSTA**

**2008**

**REJANE RODRIGUES DA COSTA**

**CONTROLE DA DISSEMINAÇÃO DE VÍRUS POR MEIO DE  
VETORES NA CULTURA DA BATATA E CARACTERIZAÇÃO  
MOLECULAR DE TRÊS ISOLADOS ATÍPICOS DE *POTATO VÍRUS*  
Y (PVY)**

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

Orientadora:

Profa. Dra. Antônia dos Reis Figueira

LAVRAS  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2008

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

Costa, Rejane Rodrigues da.

Controle da disseminação de vírus por meio de vetores na cultura da batata e caracterização molecular de três isolados atípicos de *Potato vírus Y* (PVY). -- Lavras : UFLA, 2008.

54 p.

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

Orientador: Antônia dos Reis Figueira.

Bibliografia.

1. *Myzus persicae*. 2. Batata. 3. Resíduo. 4. PVY<sup>NTN</sup>. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 635.2198

**REJANE RODRIGUES DA COSTA**

**CONTROLE DA DISSEMINAÇÃO DE VÍRUS POR MEIO DE  
VETORES NA CULTURA DA BATATA E CARACTERIZAÇÃO  
MOLECULAR DE TRÊS ISOLADOS ATÍPICOS DE *POTATO VÍRUS*  
Y (PVY)**

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

APROVADA em 01 de agosto de 2008

Prof. Dr. José da Cruz Machado

UFLA

Prof<sup>a</sup>. Dr. Claudine Márcia Carvalho

UFV

Profa. Dra. Antônia dos Reis Figueira  
Departamento de Fitopatologia / UFLA  
(Orientadora)

LAVRAS  
MINAS GERAIS - BRASIL

Aos meus pais, Robson e Maria Auxiliadora pelo eterno amor

As minhas irmãs, Rosane e Ronelza pelo companheirismo

Ao meu amor, José Luiz pela força nas horas difíceis

A todos meus amigos

**Dedico**

## **AGRADECIMENTOS**

À Deus e à Nossa Senhora pela proteção, paciência e força.

À Universidade Federal de Lavras através do Departamento de Fitopatologia pela oportunidade de cursar o mestrado e realizar este trabalho, que muito contribuíram para minha formação pessoal e profissional.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq pela concessão da bolsa de estudos.

A minha orientadora Prof. Antônia dos Reis Figueira pela orientação, pela disponibilidade, pela confiança, pelos conhecimentos adquiridos e pela compreensão.

À banca examinadora pela participação em minha defesa de dissertação através de toda contribuição na minha formação como pesquisadora.

A todos os meus companheiros e amigos de trabalho e de estudo pela amizade, pelos momentos de discussão, pela boa vontade, pelo apoio, pelo companheirismo, pela ajuda na condução dos experimentos, pelas trocas de informação e pelo incentivo.

Aos funcionários do Departamento de Fitopatologia, em especial aos do Centro de Indexação de Vírus da UFLA pelos serviços prestados, pela boa vontade, pela ajuda, pela compreensão e pelo carinho.

Aos meus pais Robson e Maria Auxiliadora, minhas irmãs Rosane e Ronelza e ao meu namorado José Luiz pela força, pelo amor e pelos valores transmitidos que me fazem resistir e continuar mesmo quando está tudo muito difícil.

Aos meus familiares pelo incentivo e pela torcida.

Aos meus queridos amigos que muitas vezes me ouviram, apoiaram-me, ajudaram-me e me alegraram.

## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b> .....	i
<b>ABSTRACT</b> .....	iii
<b>ARTIGO 1: Controle de vetores virais na cultura da batata</b> .....	1
Resumo .....	2
Abstract .....	4
Introdução .....	5
Material e Métodos .....	7
Resultados e Discussão .....	9
Conclusões .....	18
Referências Bibliográficas .....	19
<b>ARTIGO 2: Caracterização molecular de um novo isolado de <i>Potato virus Y (PVY)</i></b> .....	24
Resumo .....	25
Abstract .....	27
Introdução .....	29
Material e Métodos .....	31
Resultados e Discussão .....	36
Conclusões .....	50
Referências Bibliográficas .....	51

## RESUMO

COSTA, Rejane Rodrigues da. **Controle da disseminação de vírus por meio de vetores na cultura da batata e caracterização molecular de três isolados atípicos de *Potato vírus Y* (PVY)**. 2008. 54p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia)-Universidade Federal de Lavras, Lavras.

Foi realizado um experimento de campo com o objetivo de se verificar o efeito de tratamentos inseticidas na produção e no controle da disseminação de vírus por afídeos vetores. O método empregado foi o de blocos inteiramente casualizados, com quatro repetições e duas cultivares, Ágata e Emeraude, empregando-se dez tratamentos inseticidas, dois tratamentos combinado-se inseticidas com o fungicida Cabrio Top e o controle, sem tratamento. Após a colheita foram avaliadas a incidência de vírus, a produção e o teor de resíduos nos tubérculos de batata produzidos. Foram também caracterizados três isolados virais, diagnosticados por DAS-ELISA como PVY e com sintomas de topo crespo, denominados de AGA-IP, MON-SP e AST-SP. Na caracterização biológica, foram inoculadas mecanicamente espécies pertencentes a três famílias botânicas: *Solonaceae*, *Amaranthaceae*, *Chenopodiaceae*. A caracterização molecular foi feita empregando-se um conjunto de *primers* específicos para diferenciação de isolados por RT-PCR e um par *primers* desenhados para amplificar o gene da capa protéica, que foi seqüenciado e analisado, fazendo-se a comparação entre os isolados estudados e outros 18 isolados de PVY disponíveis no "GenBank". No teste com os inseticidas, os diferentes tratamentos não impediram a disseminação do PVY no campo, mostrando que o tratamento com inseticidas torna-se ineficaz quando a semente empregada possui um alto índice desse vírus. As plantas tratadas com Cabrio Top n+ Phorate no sulco de plantio, apresentaram maior produção em relação aos demais tratamentos. Nenhum dos tratamentos com inseticidas deixou resíduos nos tubérculos, que apresentassem valores acima dos permitidos pela ANVISA, sugerindo que a concentração indicada pelo fabricante é segura para o consumidor. As plantas de *Chenopodium quinoa*, *C. amaranticolor*, *Gompherena globosa*, *Datura stramonium*, *Nicandra physaloides* e as de pimentão (*Capsicum anuum*) cv. Florida VR2 foram imunes a todos os três isolados. As demais cultivares testadas, *Physalis floridana*, *Nicotiana glutinosa*, *N. rústica* e *N. tabacum* cvs. Havana, Turkish, Turkish NN e White burley reagiram com mosaico severo ao isolado AGA-IP e mosaico intermediário aos isolados MON-SP e AST-SP. Além de mosaico severo, as cultivares de fumo Turkish, Turkish NN e White burley apresentaram necrose severa nas nervuras, nanismo e morte das folhas mais velhas, quando infectadas com AGA-IP. As cultivares de pimentão Yolo Y e Bastidon reagiram com mosaico intermediário aos três isolados. O conjunto de *primers* empregado amplificou uma banda com 609 pb, característica da estirpe necrótica do PVY, variante PVY<sup>NTN</sup>, para os três isolados estudados.



Quando a seqüência de nucleotídeos foi analisada, as identidades entre os isolados estudados foram iguais entre todos eles, sendo de 96% . Entretanto, a identidades de aminoácidos foi igual a 96% apenas entre o isolado PVY-AGA e o PVY-MON, enquanto que e a identidades entre os isolados PVY-AST e PVY-MON foi de 95% e a entre o PVY-AGA e o PVY-AST foi de 94%. Comparando-se com os demais isolados do GenBank, a maior identidade dos três isolados foi com isolados da China e dos Estados Unidos, sendo que maior identidade observada foi de 98% entre o isolado PVY-AGA e o DDQ157180 dos Estados Unidos, denominado de NE-11. O mesmo foi observado na identidade de aminoácidos desses dois isolados. Na árvore filogenética construída com base nos nucleotídeos, os isolados se separaram em dois grandes grupos, com os isolados brasileiros no segundo grupo, sendo que os isolados PVY-MON e PVY- AST se agruparam em um clado e o PVY-AGA em outro clado, próximo ao DQ157180. Já na árvore baseada na seqüência de aminoácidos, os três isolados se separaram em clados diferentes, tendo o PVY-AST se agrupado separadamente de todos os demais, na posição de ancestral comum de todos os demais isolados.

<sup>1</sup> **Comitê de Orientação:** Antônia dos Reis Figueira- UFLA (Orientadora)

## ABSTRACT

COSTA, Rejane Rodrigues da. **Control of virus spread through vectors on potato field and molecular characterization of three atypical isolates of *Potato virus Y* (PVY)**. 2008. 54p. Dissertation (Master Program in Fitopatologia)-Federal University of Lavras, Lavras.<sup>1</sup>

In order to study the effect of insecticide treatments on virus spread by aphid vectors and on yield of two potato cultivars, a field experiment was carried out in Lavras-MG-Brazil, using randomized blocks, with 40 tubers for plot and four replicates. Potato tubers of Agata and Emeraude cultivars, with known virus incidence, were submitted to eight combinations of insecticide treatments, two treatments with insecticides plus fungicide Cabrio Top and two controls with no treatments. After the harvest were evaluated the virus incidence, yield and the insecticides residue in the potato tubers. Besides, three atypical isolates of the *Potato virus Y* (PVY) detected in Minas Gerais and Sao Paulo State-Brazil were also studied. It was accomplished through mechanical inoculation in species of *Solanaceae*, *Amaranthaceae* and *Chenopodiaceae* families, and through molecular characterization, identifying the PVY strain and performing the nucleotide and amino acid analysis of the coat protein gene. All the treatments with insecticides did not decrease the PVY spread in the field, showing that the insecticides are useless when seed potato with high virus incidence is used for sewing. The potato tubers submitted to all the treatments did not show any value of insecticides residue, higher than those allowed by ANVISA, suggesting that the concentration recommended by the manufacturer is safe for the consumer. The plants treated with Cabrio Top + Phorate on sewing presented higher yield when compared with the control and with other treatments. After mechanical inoculation, plants of *Chenopodium quinoa*, *C. amaranticolor*, *Gomphrena globosa*, *Datura stramonium*, *Nicandra physaloides* and *Capsicum anuum* cv. Florida VR2 were immune to all the three isolates. The other inoculated species, *Physalis floridana*, *Nicotiana glutinosa*, *N. rustica* e *N. tabacum* cvs. Havana, Turkish, Turkish NN e White burley, presented severe mosaic to PVY-AGA isolate and mild mosaic to PVY-AST and PVY-MON. Besides severe mosaic, the tobacco plants cvs. Turkish, Turkish NN and White Burley showed severe vein necrosis, dwarfing and death of old leaves when infected with PVY-AGA. The pepper cultivars, Yolo Y and Bastidon, showed the same mild mosaic when infected with the three virus isolates. The RT-PCR with specific primers allowed to obtain a 609 pb fragment for all the isolates, indicating that they were a variant of the necrotic strain of PVY, which causes tuber necrosis, named PVY<sup>NTN</sup>. The analysis of nucleotide sequence showed that the identity among the three studies PVY isolates had the same value, 96%. However, the identity of amino acids were different, being 96% only between the PVY-AGA and PVY-MON. The identity between PVY-AST

and PVY-MON was 95% and between PVY-AGA and PVY-AST was 94%. Comparing the three studied PVY isolates with other 18 PVY isolates from GenBank the highest nucleotide identity (98%) was observed among PVY-AGA and three isolates from China and one from United States. The highest amino acid identity (98%) was maintained only between PVY-AGA and DQ157180 from USA, named NE-11. In the phylogenetic tree based on the nucleotide sequence, the isolates were located into two groups, and two main subgroups each. The Brazilian isolates were located on the same group, but PVY-AST and PVY-MON were in one subgroup and the PVY-AGA in another one, together with DQ157180. In the phylogenetic tree based on the amino acid sequence, the three Brazilian PVY isolates were displaced separately, but PVY-AGA still was closer to DQ157180 indicating its origin similarity. The PVY-AST isolate behaved as the common ancestor of all the PVY isolates which were analyzed.

<sup>1</sup>Guidance Committee: Antônia dos Reis Figueira- UFLA (Advisor)

## **ARTIGO 1**

### **CONTROLE DA DISSEMINAÇÃO DE VÍRUS POR MEIO DE VETORES NA CULTURA DA BATATA**

(Preparado de acordo com as normas da revista “Acta Scientiarum”)

Rejane Rodrigues da Costa<sup>1</sup>, Antônia dos Reis Figueira<sup>1</sup>, Francisco de Assis  
Câmara Rabelo Filho<sup>1</sup>, João Eduardo Almeida Correia<sup>1</sup>, José Luiz Sandes de  
Carvalho Filho<sup>1</sup>, Cleiton Lourenço Oliveira<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal de Lavras, Departamento de Fitopatologia, CEP  
37200-000, Caixa Postal 3037, Lavras, MG, e-mail:  
rejanercosta@yahoo.com.br

Autora para correspondência: Rejane Rodrigues da Costa

---

Costa, R. R., Figueira, A. R., Rabelo Filho, F. A. C., Correia, J. E. A.,  
Carvalho Filho, J.L.S., Oliveira, C. L. Controle de vetores virais na cultura  
da batata. Tropical Plant Pathology.

## CONTROLE DA DISSEMINAÇÃO DE VÍRUS POR MEIO DE VETORES NA CULTURA DA BATATA

### RESUMO

O objetivo desse experimento foi verificar o efeito de tratamentos inseticidas, na produção e no controle da disseminação de vírus por afídeos vetores, e o teor de resíduos observados nos tubérculos submetidos a esses tratamentos. Foram empregadas duas cultivares, Ágata e Emeraude, com incidência inicial de *Potato vírus Y* (PVY) de 45 e 38%, respectivamente. O modelo utilizado foi o de blocos inteiramente casualizados, com 12 tratamentos, e quatro repetições, sendo: 1) pulverização semanal, com a última aos 55 dias após o plantio (DAP); 2) pulverização semanal com a última aos 69 DAP; 3) pulverização semanal, com a última aos 69 DAP + aplicação de Cabrio Top; 4) pulverização a cada 5 dias, sendo a última aos 69 DAP 5) pulverização semanal, sendo a última aos 80 DAP e 6) controle, sem pulverização, todos combinados com 2 tratamentos de sulco (Imidacloprid e Phorate). Após a colheita foram avaliados o número e o peso de tubérculos/parcela, a incidência de vírus por DAS-ELISA e o teor de resíduos nos tubérculos produzidos. Na maioria dos tratamentos a incidência final de vírus apresentou uma tendência de ser menor nos tratamentos com aplicação de Imidacloprid, quando comparada com a daqueles que tiveram a aplicação de Phorate no sulco de plantio. Entretanto, observou-se que a maioria dos tratamentos não impediu a disseminação dos vírus, principalmente na cv. Emeraude que iniciou com uma incidência de 35% e apresentou uma incidência final variando de 46 a 53% nas parcelas tratadas com Imidacloprid no sulco e de 48 a 63% nas parcelas tratadas com Phorate. Isso demonstra que o uso de inseticidas não impede a disseminação do PVY quando a sementes apresentam um alto índice desse vírus, o que pode ser explicado devido ao seu tipo de transmissão que é não persistente. Plantas tratadas com Imidacloprid e/ou Phorate + Cabrio Top apresentaram um pequeno aumento de produção em relação às controle. Da mesma forma, houve uma tendência de ganho na produção das parcelas tratadas com Imidacloprid, mas nem sempre os tubérculos com maior incidência de vírus apresentaram a maior produção, provavelmente porque a infecção da planta ocorreu no final do ciclo, não afetando a sua produtividade. Os resíduos observados nos tubérculos submetidos aos diversos tratamentos apresentaram valores abaixo dos permitidos pela ANVISA, sugerindo que as concentrações e os cronograma de

aplicação prescritos pelos fabricantes são seguros, não oferecendo risco para o consumidor.

**Palavras-chave adicionais:** *Myzus persicae*, *Potato vírus Y*

## CONTROL OF VIRUS SPREAD THROUGH VECTORS ON POTATO FIELDS

### ABSTRACT

The objective of this work was to investigate the effect of insecticide treatments on virus spread and in potato yield as well as to evaluate the residue value of the employed insecticides in the produced tubers. The experiment was carried out with two potato cultivars, Agata and Emeraude, with 38% and 45% of *Potato virus Y* (PVY) incidence, respectively, in randomized blocks with 40 tubers, four replicates and 12 treatments as follows: 1) insecticide spraying on leaves once a week, with the last application at 55 days after planting (DAP); 2) insecticide spraying on leaves once a week, with the last application at 69 DAP; 3) insecticide spraying on leaves once a week, with the last application at 69 DAP + application of Cabrio Top; 4) insecticide spraying on leaves each five days, with the last application at 69 DAP 5) insecticide spraying on leaves once a week, with the last application at 80 DAP and 6) control, with no insecticides after plant emergence, and all of them combined with 2 soil treatments (Imidacloprid and Phorate). After harvest the number and weight of tubers/parcel, the virus incidence by DAS-ELISA and the residue value of the used insecticides on produced tubers were evaluated. In the majority of the treatments the final PVY incidence was lower in those combined with the application of Imidacloprid in the soil, when they were compared with those treated with Phorate. However, the majority of treatments also did not avoid the PVY spread, mainly in cv. Emeraude. The initial incidence of this cultivar was 38% and increased to a final incidence ranging from 46 to 53% in the plants treated with Imidacloprid and from 48 to 63% in the plants treated with Phorate. Those results show that the application of insecticides is useless when the seed potato has a high PVY incidence, because of its transmission mechanism by vector, which is non persistent. The potato plants treated with Phorate and/or with Imidacloprid + Cabrio Top showed a light increasing in yield when compared with controls. Similarly, there was an increase on potato yield treated with Imidacloprid, but there was no correspondence between the virus incidence and yield in all the treatments. It is probably because the plants were infected at the end of their life cycle, which did not affect the yield. The value of insecticides residue detected in the tubers submitted to all the treatments were lower than those allowed by ANVISA, suggesting that the insecticides concentration and the application schedule prescribed by manufactures are safe and do not represent risk for consumers.

**Keywords:** *myzus persicae*, *Potato virus Y*

## INTRODUÇÃO

A batata (*Solanum tuberosum* L.) é a hortaliça mais plantada no Brasil, sendo que o estado de Minas Gerais é responsável por cerca de 1/3 da produção nacional, o que significa um milhão de toneladas anuais (Anuário da Agricultura Brasileira - AGRIANUAL, 2008). Mesmo com esse volume de produção, a sua produtividade é considerada baixa, se comparada com os países mais desenvolvidos. Para que essa produção alcance níveis sustentáveis, o desenvolvimento de pesquisas relacionadas aos seus fatores limitantes é de grande importância. Nesse contexto, a ocorrência de doença de etiologia viral se destaca por ser considerada um dos principais entraves da produção. Atualmente, o PVY (*Potato virus Y*), PLRV (*Potato leafroll virus*), PVX (*Potato virus X*) e o PVS (*Potato virus S*) são as principais fitoviroses da cultura da batata no Brasil (Souza Dias, 1995; Daniels, 1995; Figueira, 1995; Hirano, 1995; Lima, 1995). Entretanto, alguns vírus como o PVA (*Potato virus A*) e o PVM (*Potato virus M*) são também encontrados nos campos de produção, de maneira mais ocasional.

O *Potato virus Y* (PVY) é o vírus mais importante em solanáceas cultivadas e vem crescendo em importância nas lavouras de Minas Gerais, Rio Grande do Sul e de São Paulo (Figueira, 1995; Souza Dias, 1995; Daniels, 1995). Ele pertence ao gênero *Potyvirus* e pode ser transmitido mecanicamente e por enxertia, porém o seu principal meio de disseminação é através dos tubérculos e de modo não persistente por pelo menos 25 espécies de afídeos, sendo que os mais comumente encontrados em plantios de batata são o *Myzus persicae* (Sulzer), *Macrosiphum euphorbiae* (Thomas), *Aulacorthum solani* (Kaltenbach), *Metopolophium dirhodum* (Walker), *Aphis gossypii* Glover, *Lipaphis erysimi* (Kaltenbach), *Aphis fabae* Scopoli (Hemiptera: Aphididae), entre outras espécies (Bertels et al., 1971; Radcliffe, 1982). Dentre esses, o mais eficiente é o pulgão *Myzus persicae* (Cupertino et al., 1992). Dessa forma, a ocorrência de afídeos na forma alada, como vetores de vírus, aliada à presença de plantas que sirvam como



hospedeiras alternativas, tanto para o inseto vetor quanto para os fitovírus, está envolvida diretamente na disseminação e estabelecimento de viroses nas áreas de produção (Cupertino et al., 1992, 1993). Como não existem tratamentos curativos para os fitovírus, os métodos de controle empregados apenas minimizam o risco de infecções e perdas (Hull, 2002). O PLRV, vírus do tipo persistente circulativo, pode ser controlado de modo mais eficiente com inseticidas, pois nem sempre é transmitido durante a picada de prova, o que não acontece com o PVY. Ademais, a utilização de inseticidas, como os piretróides, organofosforados e carbamatos, pode induzir mudanças no comportamento dos afídeos, estimulando o seu movimento e aumentando a sua atuação na disseminação (Foster et al., 1981; Lowery & Boiteau, 1988; Irwin, 2000).

O Brasil vem sendo colocado como o segundo maior consumidor de mundial de agrotóxicos (Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA, 2006). Dentro desse cenário, os inseticidas apresentam grande importância no segmento de agrotóxicos e estão estreitamente relacionados à maioria das intoxicações (Baptista, 1999), pois, devido a sua forma de atuação, são mais tóxicos ao homem do que os fungicidas e herbicidas. Alguns produtos são considerados de alta toxicidade para animais, como o caso do inseticida Phorate que, além de ser carcinogênico, é altamente tóxico para os mamíferos, o que torna necessário o monitoramento de resíduos em tubérculos de batata (Rigitano, 1982 a, b). Estudos realizados nos Estados Unidos mostram que várias doenças graves têm origem na dieta alimentar, sendo os resíduos de pesticidas presentes nos alimentos um dos responsáveis por esta porcentagem (Caldas & Souza, 2000). Portanto, a presença de agrotóxicos nos alimentos, acima dos níveis permitidos, torna-se um grande problema para a saúde humana (Wang, 1982). Atualmente tem-se procurado desenvolver uma agricultura sustentável, o que torna importante o monitoramento dos níveis de resíduos. Entretanto, trabalhos relacionados com a quantificação de resíduos nos tubérculos são escassos.

O controle de afídeos, como vetores de vírus, através da utilização de inseticidas é limitado, devendo ser iniciado nas plantas jovens, para não permitir o desenvolvimento de grandes colônias em folhas senis, o que tornaria a translocação dos inseticidas sistêmicos ineficiente. Entretanto, nas regiões produtoras de batata, o controle de afídeos vetores de vírus, seja por via foliar ou no solo, nem sempre tem sido realizada de maneira adequada, pois frequentemente ocorre a aplicação excessiva de inseticidas, afetando diretamente o agroecossistema. Além de onerar os custos de produção, aumenta o risco da presença de resíduos químicos nos tubérculos destinados ao consumo, pois estes podem adsorver resíduos dos produtos empregados.

Para monitorar a margem de segurança dos diferentes tratamentos inseticidas empregados no controle da disseminação de viroses, torna-se importante a avaliação da presença e a quantificação de resíduos destes pesticidas em tubérculos, para verificar se estão dentro dos limites de tolerância estabelecidos. Visando estudar a eficiência dos diferentes tratamentos inseticidas que tem sido recomendados e empregados pelos bataticultores, o presente trabalho investigou o efeito de diversos produtos e cronogramas de aplicação na produção e no controle da disseminação de vírus por afídeos vetores, e determinou o teor de resíduos em tubérculos de batata submetidos a esses tratamentos, visando um manejo sustentável da produção.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

O experimento foi conduzido no período de outubro de 2007 a janeiro de 2008, na horta experimental do Departamento de Fitotecnia da Universidade Federal de Lavras, seguindo o modelo experimental de blocos casualizados (DBC), em esquema fatorial 6x2x2, sendo 6 tratamentos: 1) pulverização semanal, sendo a última aos 55 dias após o plantio (DAP) (recomendado); 2) pulverização semanal, sendo a última aos 69 DAP (permitido); 3) pulverização semanal, sendo a última aos 69 DAP +

aplicação de Cabrio Top; 4) pulverização a cada 5 dias, sendo a última aos 69 DAP 5) pulverização semanal, sendo a última aos 80 DAP (utilizado) e 6) controle, sem inseticidas), combinados com 2 inseticidas aplicados no sulco de plantio (Imidacloprid - 360g ha<sup>-1</sup> e Phorate - 20Kg ha<sup>-1</sup>), empregando-se 2 cultivares (Ágata e Emeraude), e 4 repetições. Cada parcela foi constituída por 40 tubérculos, com espaçamento de 0,8m entre linhas e de 0,3m entre plantas.

As pulverizações foram realizadas após a emergência das plantas, sendo utilizados 4 princípios ativos com ação inseticida distintos, intercalados semanalmente (deltametrina, triflumuron, imidacloprido e abamectina) para todos os tratamentos, com intervalo de 7 dias entre as aplicações, exceto para o tratamento cuja aplicação inseticida foi a cada 5 dias. Esses inseticidas constam da lista proposta pelo comitê gestor da Produção Integrada de Batata (PIB). As dosagens foram utilizadas conforme recomendação dos fabricantes. Os tubérculos selecionados para o plantio foram submetidos ao forçamento de brotação com bissulfureto de carbono (25 mL/m<sup>3</sup>) durante 72h e plantados após a emissão dos brotos. A adubação da área, com 2,8 t ha<sup>-1</sup> da formulação 4-14-8 (N, P e K), foi realizada conforme recomendação técnica, com base na análise de solo realizada pelo Laboratório de Análises de Solo da Universidade Federal de Lavras. Cerca de 40 dias após o plantio, realizou-se uma adubação de cobertura com 300kg ha<sup>-1</sup> de uréia, seguida da operação de amontoa. Todos os tratamentos receberam o fungicida Moncerem (5L ha<sup>-1</sup>) no sulco de plantio e as pragas, doenças e plantas invasoras que poderiam competir com a cultura foram monitoradas e devidamente controladas durante toda a condução do experimento.

Ao final do ciclo, os tubérculos foram colhidos e a produção foi avaliada por tamanho (tipos), empregando-se seis peneiras com malhas de 20, 30, 40, 50 e 60 mm respectivamente, sendo: tipo I)  $\geq 61$  mm, tipo II)  $\geq 51 \leq 60$ , tipo III)  $\geq 41 \leq 50$ , tipo IV)  $\geq 31 \leq 40$  e tipo V)  $\leq 21 \geq 30$  mm, e peso total dos tubérculos. Os dados obtidos foram submetidos à análise de

variância e os valores das médias foram analisados pelo teste de Tukey, utilizando o programa computacional SISVAR<sup>®</sup>.

A diagnose dos vírus PVY, PVX, PVS e PLRV foi feita pelo teste sorológico DAS-ELISA (Clark & Adams, 1977), utilizando-se antissoros policlonais da Bioreba. Os tubérculos foram analisados antes do plantio e após a colheita, sendo consideradas positivas amostras cujas absorbâncias foram iguais ou superiores a duas vezes a média da absorbância do controle sadio.

A análise de resíduo foi realizada no Laboratório de Toxicologia de Inseticidas do Departamento de Entomologia da Universidade Federal de Lavras, utilizando-se métodos analíticos baseados na Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos. Os procedimentos analíticos empregados para a determinação dos teores de resíduos de Imidacloprid e Phorate nas amostras foram baseados naqueles descritos por Placke & Weber (1993) e Szeto et al. (1990). A avaliação do teor de resíduos foi feita por comparação com os padrões estipulados pela ANVISA (2006), nos quais o nível máximo permitido para Imidacloprid é de 0,5 ppm e para Phorate de 0,5 ppm.

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

As incidências finais de PVY e a produção das plantas submetidas aos diferentes tratamentos, estão discriminadas na Tabela 1. A incidência inicial de PVY nas sementes da cv. Emeraude foi de 38% e na cv. Ágata foi de 45%, enquanto que os demais vírus estavam ausentes. Essas sementes foram obtidas de produtores não oficiais, que estavam produzindo semente própria para plantio, motivo pelo qual não apresentaram a qualidade sanitária desejável. As sementes da cv. Ágata escolhidas, foram utilizadas por se

trataram de plantas encontradas no campo com alto índice de PVY, mas que não apresentavam sintomas.

Analisando-se a incidência final pode-se observar que, de um modo geral os tratamentos em que foi empregado o Imidacloprid no sulco de plantio apresentaram uma menor disseminação final de vírus do que os tratados com Phorate, exceto quando a última pulverização foi aos 55 DAP. Mas, considerando-se que o controle, com apenas tratamento de sulco teve uma disseminação discreta na cv Ágata, esse resultado pode ter sido ocasional, uma vez que o movimento do pulgão no campo é aleatório e pode ser concentrado em uma área, caracterizando uma reboleira. Como o PVY é transmitido na picada de prova, algumas parcelas podem ter sido mais visitadas que outras. E, como o vetor pode ter o seu movimento estimulado pela ação do inseticida (Foster et al., 1981; Lowery & Boiteau, 1988; Irwin, 2000), pode ser que essa disseminação tenha ocorrido mais em uma área que em outra. A abundância de vetor na área ficou evidente nas parcelas controle da cv. Ágata, tratadas apenas com phorate no sulco de plantio, pois a disseminação atingiu 100% das plantas que não foram pulverizadas com os outros inseticidas durante o ciclo de vida da planta. Entretanto, Oliveira et al. (2004) utilizando alguns inseticidas no controle do pulgão *M. Persicae* e da mosca minadora, observou que o Phorate apresentou uma maior eficiência de controle. Segundo Groves et al. (2001), a utilização de Imidacloprid foi responsável por uma redução na incidência de *Tomato Spotted Wilt tospovirus* e para *Potato leafroll virus* (Boiteau,1999). Da mesma forma, Zagonel (2002) observou a eficiência da utilização de Imidacloprid e Thiametoxam em diferentes doses com o intuito de impedir a disseminação do *Lettuce mosaic virus* (LMV) na cultura da alface pelo pulgão *Myzus persicae*.

Considerando-se o alto índice inicial de PVY nas sementes, os tratamentos foram mais eficientes na disseminação desse vírus na cv. Ágata, pois as duas cultivares apresentaram praticamente a mesma incidência final apesar de a cv. Emeraude ter iniciado com uma incidência menor desse

vírus. Isso poderia ser explicado pela tolerância mostrada pela cv. Ágata a esse isolado de PVY, uma vez que não apresentava sintomas no campo apesar de infectada. Conforme o esperado, as plantas com maior incidência de vírus apresentaram uma menor produção. Isso ficou evidente nas plantas cv. Agata com incidências de 75 e 100% que obtiveram uma produção de 20,93 e 19,06 t. ha<sup>-1</sup>, respectivamente. As plantas cv. Emeraude com 46 a 64% de infecção apresentaram produções semelhantes. Isso pode ser explicado pela compensação que às vezes pode ser observada quando a planta vizinha infectada é menor e compete menos pelos nutrientes, fazendo com que a planta sadia apresente uma maior produtividade. Outro fator que pode contribuir para isso seria a infecção tardia, que não afeta significativamente a produção da planta.

Todos esses resultados mostram que a avaliação de disseminação e perdas causadas por doenças viróticas em plantas de batata não é uma tarefa fácil. Isso porque a disseminação depende da movimentação do vetor no campo, e parcelas situadas em diferentes posições no campo podem estar sujeitas a uma visita diferenciada de vetores. No caso do PVY, que pode ser transmitido na picada de prova, um único vetor, mesmo que a planta esteja protegida com inseticida sistêmico, pode picar e caminhar para plantas vizinhas e transmitir o vírus para mais de uma planta antes de morrer. Por outro lado, as infecções tardias vão permitir a translocação do vírus para o tubérculo, sem causar perdas significativas nas plantas. Assim sendo, pode-se estabelecer a homogeneidade do índice inicial de vírus, mas a disseminação natural nas parcelas dificilmente será homogênea em todas as repetições. Portanto, é possível observar uma tendência de comportamento da planta em cada tratamento, mas não uma diferenciação acentuada e repetitiva nos diferentes tratamentos.

**TABELA 1:** Incidências finais de PVY e produtividade em toneladas por hectare, em cada tratamento.

<b>Sulco de plantio</b>	<b>Tratamentos</b>	<b>Cultivar</b>	<b>Incidência Final de PVY (%)</b>	<b>Produtividade (t.ha<sup>-1</sup>)</b>
Imidacloprid	Pulverizações até 55 DAP	Ágata	75	20,93 b
		Emeraude	53	31,43 a
	Pulverizações até 69 DAP	Ágata	48	27,50 ab
		Emeraude*	46	29,54 ab
	Pulverizações até 69 DAP + Cabrio Top	Ágata	47	31,08 a
		Emeraude	47	30,71 a
	Pulverizações até 69 DAP (a cada 5 dias)	Ágata	47	33,15 a
		Emeraude	48	30,07 a
	Pulverizações até 80 DAP	Ágata	47	27,58 ab
		Emeraude	48	40,03 a
Controle	Ágata	50	22,93 ab	
	Emeraude	50	29,44 ab	
Phorate	Pulverizações até 55 DAP	Ágata	65	23,73 ab
		Emeraude	48	31,41 a
	Pulverizações até 69 DAP	Ágata	59	31,08 a
		Emeraude	53	30,71 a
	Pulverizações até 69 DAP + Cabrio Top	Ágata	48	32,93 a
		Emeraude	48	36,56 a
	Pulverizações até 69 DAP (a cada 5 dias)	Ágata	50	25,42 ab
		Emeraude	52	27,47 ab
	Pulverizações até 80 DAP	Ágata	65	24,05 ab
		Emeraude	64	29,63 ab
Controle	Ágata	100	19,06 b	
	Emeraude	63	27,59 ab	

Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. \*Incidência final de 13% de PLRV.

As parcelas tratadas com Cabrio Top tiveram uma tendência de apresentar maior produção apenas nas parcelas que empregaram Phorate no sulco. Esse fungicida que tem como princípio ativo piraclostrobia + metiran (dietilditiocarbamato), tem sido associado a um aumento no porte e vigor com conseqüente aumento da produção da planta de batata (Koehle et al., 2002). As estrobilurinas são compostos secundários com ação mitocondrial específica, que atua na inibição do transporte de elétrons entre o citocromo **b** e o citocromo **c** na cadeia transportadora de elétrons, causando diminuição na produção de ATP (Anke, 1995) e acidificação no citoplasma, aumentando assim a atividade da enzima nitrato redutase e conseqüentemente, a assimilação de nitrogênio (Glaab & Kaiser, 1999). A nitrato redutase também possui uma rota alternativa que produz óxido nítrico, o qual é um agente importante de sinalização contra ataque de patógenos, além de inibir os precursores do etileno, ACC sintase e ACC oxidase (Venâncio et al., 2004). A literatura apresenta duas hipóteses para explicar aumento da produtividade em plantas tratadas com estrobilurina (Venâncio et al., 2004). Segundo Köehle et al. (2002), a primeira seria decorrente da alteração de processos fisiológicos incluindo: o ponto de compensação de dióxido de carbono, a senescência foliar (devido a uma maior quantidade de nitrito produzido e, conseqüentemente em uma maior produção de proteína), a ACC-sintase e desta forma biossíntese de etileno, o conteúdo de clorofila, a atividade fotossintética, a abertura de estômatos, o consumo de água, a atividade de enzimas antioxidantes, os níveis de ácido abscísico e outros hormônios vegetais e ainda, a atividade da enzima nitrato redutase (elevando a qualidade e rendimento da colheita para o produtor). A segunda hipótese é de que a molécula da estrobilurina preveniria a germinação de esporos de fungos patogênicos, não patogênicos e saprófitos interrompendo assim, os elicitores que demandam perdas de energia em respostas à defesa do hospedeiro (Bergmann et al., 1999; Venâncio et al., 2004). Experimentos anteriores já demonstraram, entretanto, que pode haver uma interação do tratamento com Cabrio Top e



as condições ambientais, incluindo a fertilidade do solo, e o ganho de produção parece ser mais evidente em solos mais pobres em nitrogênio, onde plantas tratadas com esse produto parecem compensar essa deficiência, estimulando a produtividade da planta (Rabelo Filho et al., 2007). Também nesse experimento, houve uma tendência de ganho entre as parcelas tratadas com Imidacloprid, que tiveram um maior desempenho em relação às tratadas com phorate.

A produção por tipo de tubérculos está discriminada na Tabela 2. O peso dos tubérculos maiores, dos tipos I e II, tenderam a ser maiores nas parcelas tratadas com Imidacloprid no sulco e com Cabrio Top, tanto na cv. Ágata como na Emeraude. Entretanto, esses resultados não chegaram a ser estatisticamente diferentes. Já o peso total dos tubérculos tratados com esse produto foi estatisticamente maior do que o controle tratado apenas com phorate, mas não com o controle tratado com Imidacloprid. Quando se considera o número de tubérculos (Tabela 3), as parcelas controle da cv. Ágata tratadas com Imidacloprid produziram um número maior de tubérculos do tipo 2,4 e 5 e total, do que as tratadas com phorate, o que não foi observado na cv. Emeraude.

Os valores obtidos nas análises de resíduos de agrotóxicos, em conjunto com outros dados, geram os valores de limite máximo de resíduos (LMR), expresso em  $\text{mg Kg}^{-1}$ , que é a quantidade máxima de resíduo de um pesticida que pode estar legalmente presente nos nossos alimentos sem causar danos à saúde do consumidor. Dessa forma, os teores de resíduos de Imidacloprid nas amostras de tubérculos de batata (TABELA 4), estão abaixo do LMR, não fornecendo risco ao consumidor. Portanto, mesmo sendo aplicado até os 80 DAP, os produtos empregados nas concentrações indicadas nesse trabalho não representam perigo para a cultura. O único problema é que nem sempre a concentração indicada é respeitada pelos agricultores.

Caldas et al. (2004) fez a análise de resíduos em batata e outras culturas, mas também não observou níveis de resíduo acima do limite máximo permitido para as culturas. Por outro lado, o inseticida e acaricida clorpirifós, tem sido encontrado em análises de multiresíduos de agrotóxicos, feitas em culturas para as quais esse produto não foi registrado, ou em níveis acima do permitido naquelas para as quais estão registrados, podendo ser resultado da contaminação ambiental acidental ou pelo desrespeito às boas práticas agrícolas (Amaral & Parma, 2002). Ciscato (2004) analisando 182 amostras de hortaliças comercializadas no Município de São Paulo, para verificar se os resíduos estavam de acordo com a legislação brasileira, observaram a presença de resíduos em 31,9% das amostras, sendo que 1,1% estavam em níveis acima do Limite Máximo de Resíduos (LMR) e 20,9% apresentavam resíduos de pesticidas não registrados para uso nas culturas. O uso intensivo produtos fitossanitários no controle de pulgões, onera o custo de produção, podendo levar ao desenvolvimento de vários mecanismos de resistência dos insetos aos principais grupos de inseticidas. Dessa forma, inúmeros problemas ambientais são atribuídos à utilização de agrotóxicos, dentre eles a contaminação do solo, da água, a presença de resíduos nos alimentos e prejuízos à saúde dos trabalhadores rurais (Darolt, 2007).

**TABELA 2:** Produção (Kg/parcela) de cada um dos tipos de tubérculo produzidos pelas duas cultivares, Ágata (AGA) e Emerald (EME) submetidas aos diferentes tratamentos.

Tratamento/ Classificação	Tipo 1		Tipo 2		Tipo 3		Tipo 4		Tipo 5		Peso total	
	AGA	EME	AGA	EME	AGA	EME	AGA	EME	AGA	EME	AGA	EME
<b>1*Imidacloprid</b>	6.80 a	6.22 a	7.19 b	10.87 a	3.79 b	9.26 a	1.61 b	2.79 b	0.69 b	1.01 a	20.09 b	30.17 ab
<b>1*Phorate</b>	6.86 a	6.48 a	7.48 ab	9.03 a	5.41 ab	8.44 a	2.14 ab	2.93 ab	0.92 b	3.26 a	22.78 ab	30.15 ab
<b>2*Imidacloprid</b>	7.41 a	5.64 a	9.78 a	8.61 a	5.65 ab	8.73 a	2.29 ab	3.97ab	1.25 ab	1.37 a	26.40 ab	28.35 ab
<b>2* Phorate</b>	6.63 a	5.36 a	9.32 a	10.02 ab	8.99 a	8.93 a	3.53 a	3.69 ab	1.35 ab	1.45 a	29.83 a	29.48 ab
<b>3*Imidacloprid</b>	8.46 a	8.66 a	9.28 a	13.82 a	5.64 ab	9.25 a	2.04 ab	4.93 a	1.03 ab	1.75 a	26.47 ab	38.42 a
<b>3* Phorate</b>	6.49 a	4.09 a	7.33 ab	7.70 ab	5.72 ab	10.71 a	2.21 ab	4.25 a	1.31 ab	1.68 a	23.08 ab	28.44 ab
<b>4*Imidacloprid</b>	6,93 a	4,31 a	10,75 a	7,72 a	7,48 a	7,03 b	2,25 ab	3,00 ab	1,31 ab	1,37 a	28,72 a	23,46 ab
<b>4* Phorate</b>	7,70 a	5,89 a	7,99 b	11,14 a	5,30 ab	12,24 a	1,89 ab	4,56 a	1,89 a	1,25 a	24,78 ab	35,10 a
<b>5*Imidacloprid</b>	8,96 a	5,13 a	9,80 a	9,42 a	8,56 a	8,85 a	2,97 a	3,74 ab	1,52 ab	1,72 a	31,82 a	28,87 ab
<b>5* Phorate</b>	5,38 a	4,91 a	7,55 a	8,43 a	7,51 a	7,42 ab	2,73 a	4,29 a	1,21 a	1,31 a	24,40 ab	26,37 ab
<b>6*Imidacloprid</b>	5,77 a	3,94 a	9,97 a	8,46 a	9,49 a	10,43 a	4,19 a	3,82 ab	2,17 a	1,59 a	31,61 a	28,26 ab
<b>6* Phorate</b>	4,39 a	3,95 a	5,71 b	7,31 ab	5,08 ab	9,09 a	2,04 ab	4,03 ab	1,05 b	2,10 a	18,29 b	26,48 b

Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

1\*- Pulverizações até 55 DAP, 2\*- Pulverizações até 69 DAP, 3\*- Pulverizações até 69 DAP + CABRIO TOP, 4\*- Pulverizações até 69 DAP (a cada 5 dias), 5\*- Pulverizações até 80 DAP, 6\*- Controle

**TABELA 3:** Número de tubérculos dos tipos 1 a 5 produzidos pela duas cultivares, Ágata (AGA) e Emeraude (EME) submetidas aos diferentes tratamentos.

Tratamento/ Classificação	Tipo 1		Tipo 2		Tipo 3		Tipo 4		Tipo 5		Peso total	
	AGA	EME	AGA	EME	AGA	EME	AGA	EME	AGA	EME	AGA	EME
<b>1*Imidacloprid</b>	29 ab	24 ab	50 a	71 ab	48 b	98 a	39 b	60 a	28 b	37 b	196 b	291 ab
<b>1*Phorate</b>	26 ab	19 b	58 a	56 ab	68 ab	91 ab	48 ab	59 a	45 ab	51 ab	246 ab	278 ab
<b>2*Imidacloprid</b>	58 a	22 b	66 a	54 ab	62 ab	95 a	43 ab	81 a	41 ab	54 ab	273 ab	308 ab
<b>2* Phorate</b>	26 ab	18 b	61 a	57 ab	95 a	90 a	74 a	70 a	69 ab	54 ab	327 ab	292 ab
<b>3*Imidacloprid</b>	28 ab	15 b	78 a	50 b	98 a	79 ab	59 ab	62 a	37 b	51 ab	302 ab	258 b
<b>3* Phorate</b>	27 ab	19 b	53 ab	65 ab	61 ab	124 a	39 b	84 a	39 b	62 ab	220 ab	356 ab
<b>4*Imidacloprid</b>	32 ab	19 b	73 a	55 ab	102 a	88 ab	68 ab	67 a	68 ab	62 ab	344 ab	293 ab
<b>4* Phorate</b>	20 b	17 b	52 ab	50 b	92 a	74 b	58 ab	80 a	57 ab	52 ab	281 ab	276 ab
<b>5*Imidacloprid</b>	33 ab	30 a	63 a	82 a	65 ab	123 a	45 ab	96 a	49 ab	74 ab	257 ab	406 a
<b>5* Phorate</b>	27 ab	14 b	57 ab	66 ab	67 ab	108 a	44 ab	69 a	49 ab	73 ab	246 ab	332 ab
<b>6*Imidacloprid</b>	19 b	12 b	61 a	49 b	125 a	100 a	77 a	67 a	82 a	54 ab	367 a	284 ab
<b>6* Phorate</b>	20 b	14 b	37 b	51 b	56 ab	91 ab	36 b	77 a	35 b	90 a	187 b	324 ab

Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

1\*- Pulverizações até 55 DAP, 2\*- Pulverizações até 69 DAP, 3\*- Pulverizações até 69 DAP + CABRIO TOP, 4\*- Pulverizações até 69 DAP (a cada 5 dias), 5\*- Pulverizações até 80 DAP, 6\*- Controle

**TABELA 4:** Teores médios de resíduos observados em todas as parcelas tratadas com Phorate e/ou Imidacloprid.

Cultivar	Análise resíduo (mg. Kg <sup>-1</sup> )	
	Phorate	Imidacloprid
Ágata	0,03	0,012
Emeraude	0,07	0,011

## CONCLUSÕES

1. As plantas que foram tratadas com Imidacloprid, no sulco de plantio, apresentaram uma menor disseminação do *Potato virus Y* (PVY) na maioria das combinações com inseticidas foliares, quando comparadas às plantas tratadas com Phorate.
2. A disseminação do *Potato vírus Y* (PVY) na cultivar Ágata foi menor do que na cv. Emeraude, mostrando que a primeira tem uma maior resistência de campo a esse vírus.
3. As plantas tratadas com o fungicida Cabrio Top apresentaram uma maior produção, em relação às controles, nas parcelas tratadas com no Phorate no sulco.
4. O uso de inseticidas não impediu a disseminação do PVY pelo vetor, provavelmente devido ao alto índice inicial de vírus nas sementes.
5. Os teores de resíduos nos tubérculos produzidos pelas plantas submetidas a todos os tratamentos ficaram abaixo do limite máximo recomendado pela ANVISA, mostrando que as concentrações e cronogramas de aplicação indicados pelo fabricante é seguro para o consumidor.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGENCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resíduos de agrotóxicos em alimentos. **Revista Saúde Pública**, São Paulo, v. 40, n. 2, p. 361-3, abr. 2006.

AMARAL, E. H.; PARMA, C. Controle de resíduo de agrotóxico em produtos agrícolas. In: SEMINÁRIO NACIONAL SOBRE AGROTÓXICOS, 2002, Belo Horizonte, MG. **Palestras...** Belo Horizonte, MG, 2002.

ANKE, T. The antifungal strobilurins and their possible ecological role. **Canadian Journal Botany**, Ottawa, v. 73, n. 1, p. 940-945, 1995.

ANUÁRIO DA AGRICULTURA BRASILEIRA. São Paulo: FNP Consultoria, 2008.

BAPTISTA, G. C. de. Desenvolvimento do uso de pesticidas / inseticidas. In: GRUPO DE ANALISTAS DE RESÍDUOS DE PESTICIDAS. **Manual de resíduos de pesticidas em alimentos**. São Paulo, 1999. p.6-11.

BERGMANN, H.; LIPPMANN, B.; LEINHOS, V.; TIROKE, S.; MACHELETT, B. Activation of stress resistance in plants and consequences for product quality. **Journal Application of Botany**, Berlin, v. 73, p.153-161, 1999.

BERTELS, A.; FERREIRA, E. ; CASA GRANDE, W. Problemas de vetores de vírus da batata e seu combate nas condições do Rio Grande do Sul. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 6, p. 291-306, 1971.

BOITEAU, G. E.; SINGH, R. P. **American Journal of Potato Research**, v. 76, n. 1, p. 31-36, 1999.

CALDAS, E. D. E ; SOUZA, L. C. K. R. Avaliação de risco crônico da ingestão de resíduos de pesticidas na dieta brasileira. **Revista Saúde Pública**, São Paulo, v. 34, n. 5, p. 529-537, out. 2000.

CALDAS, E. D; MIRANDA, M. C. C; CONCEIÇÃO, M. H; SOUZA, L. C. K. R. de. Dithiocarbamates residues in Brazilian food and the potential risks of consumers. **Food and Chemical Toxicology**, v. 42, n. 11, p. 1877-1883, Nov. 2004.

CISCATO, C. H. P.; GEBARA, A. B.; MONTEIRO, S. H.; RASPE, J.; FERREIRA, C. B. Resíduos de Pesticidas em Hortaliças. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.71, p.1-749, 2004.

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

CUPERTINO, F. P.; COSTA, C. L.; MELO, A.B. P.; SUDO, S.; SILVA, A. M. R. Transmissão de estirpes de PVY vindas de batata, pimentão ou tomate por meio de *Myzus persicae*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 17, p.187, 1992.

CUPERTINO, F. P.; COSTA, C. L.; SILVA, A. M. R. Transmissão de três estirpes do vírus Y da batata por *Myzus nicotianae*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 18, p. 102-106, 1993.

DANIELS, J. Incidência do vírus Y da batata (PVY) em lavouras e em lotes de tubérculos-semente de produtores de São Joaquim, SC e de Bom Jesus, RS, no período de 1995/6. In: REUNIÃO TÉCNICA ANUAL DE PESQUISA E EXTENSÃO DA CULTURA DA BATATA NO RIO GRANDE DO SUL E SANTA CATARINA, 1996, Santa Maria, 1996. **Anais...** Santa Maria, 1996. 40 p.

DAROLT, M. R. **As principais correntes do movimento orgânico e suas articularidades**. 2007. Disponível em: <<http://www.planetaorganico.com.br/trabdurolt.htm>>. Acesso em: 04 jul. 2008.

FIGUEIRA, A. R. Vírus da batata e suas implicações na produção de batata-semente no estado de Minas Gerais : histórico do problema e soluções. **Summa Phytopathologica**, Piracicaba, v. 21, n. 3/4, p. 268-269, 1995.

FOSTER, G. N.; MCKINLAY, R. G.; SHAW, M. W.; AVEYARD, C. S.; GORDON, S. C. ; WOODFORD, J. A. T. The control of the aphids and leafroll virus disease of potatoes by granular insecticides. In: CONFERENCE ON CROP PROTECTION IN NORTHERN BRITAIN, 1981, North Brit. **Anais...**North Brit, 1981. p. 91-96.

GLAAB, J.; KAISER, W. M. Increased nitrate reductase activity in leaf tissues after application of the fungicide Kresoxim-methyl. **Planta**, Berlin, v. 207, p. 442-448, 1999.

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**, v. 20, n. 5, p. 439-445, June 2001.

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

HULL, R. **Matthews' plant virology**. 4. ed. San Diego: Academic, 2002. 1001 p.

IRWIN, M. E.; RUESINK, W. G.; ISARD, S. A.; KAMPMEIER, G. E. Mitigating epidemics caused by non-persistently transmitted aphid-borne viruses: the role of the plant environment. **Virus Research**, v. 71, p. 185-211, 2000.



KÖEHLE, H.; GROSSMANN, K.; JABS, T.; GERHARD, M.; KAISER, W.; GLAAB, J.; CONRATH, U.; SEEHAUS, K.; HERMS, S. Physiological effects of the strobilurin fungicide F 500 on plants. In: DEHNE, H. W.; GISI, U.; KUCK, K.H.; RUSSELL, P. E.; LYR, H. (Ed.) **Modern fungicides and antifungal compounds III**. Andover: AgroConcept GmbH Bonn, 2002, p. 61–74.

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. 2, n. 3/4, p. 272-273, 1995.

LOWERY, D. T; BOITEAU, G. Effects of five insecticides on the probing, walking, and settling behavior of the green peach aphid and the buckthorn aphid (Homoptera: Aphididae) on potato. **Journal Economic Entomology**, v. 81, p. 208–214, 1988.

OLIVEIRA, D. R. ; SILVA, E. C. ; MACIEL, G. M. . Avaliação de inseticidas no controle da mosca minadora e pulgões em cultura de batata. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE OLERICULTURA, 44., 2004, Campo Grande, MS. **Anais...** Brasília, DF, 2004. v. 22

PLACKE, F. J.; WEBER, E. Method of determining imidacloprid residues in plant materials. **Pflanzenschutz- Nachrichten Bayer**, v. 46, p. 109-182, 1993.

RABELO FILHO, F. A. C.; FIGUEIRA, A. R. ; PÁDUA, J. G.; MESQUITA, H. A.; RIBEIRO, S. R. R. P. Efeito do nível de adubação e do tratamento com Cabrio Top na produção e na incidência de vírus em batata cv. Cupido. In: ENCONTRO NACIONAL DE PRODUÇÃO E ABASTECIMENTO DA BATATA, 8., SEMINÁRIO NACIONAL DE BATATA SEMENTE, 9., 2007, Holambra,SP. **Anais...** Holambra, SP, 2007.

RADCLIFFE, E. B. Insect pests of potato. **Annual Reviews of Entomology**, Palo Alto, v. 27, p. 173-204, 1982.

RIGITANO, R. L. O. Persistência de resíduos de methyl parathion e quinalphos em frutos do tomateiro (*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.

SOUZA DIAS, J. A. C. Viroses de 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.

SZETO, S.Y.; PRICE, P. M.; MACKENZIE, J. R.; VERNON, R. S. Persistence and uptake of phorate in mineral and organic soils. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 38, n. 2, p. 501-504 501, Feb. 1990.

VENÂNCIO, W. S.; RODRIGUES, M. A. T.; BEGLIOMINI, E.; SOUZA, N. L. Physiological effects of strobilurin fungicides on plants. **Exact and Earth Sciences, Agrarian Sciences and Engineering**, Ponta Grossa, v. 9, n. 3, p.59-68, 2004.

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.

ZAGONEL, J. Eficiência de programas de controle de doenças fúngicas na cultura do feijão. p.145-148. In: CONGRESSO NACIONAL DE PESQUISA DE FEIJÃO, 7., 2002,Viçosa, MG.. **Anais...** Viçosa, MG, 2002. p. 145-148.

## ARTIGO 2

### CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE TRÊS ISOLADOS ATÍPICOS DE *POTATO VÍRUS Y* (PVY)

(Preparado de acordo com as normas da revista “Tropical Plant Pathology”)

Rejane Rodrigues da Costa<sup>1</sup>, Antônia dos Reis Figueira<sup>1</sup>, Valquíria Nogueira  
Camargos<sup>1</sup>, Alessandra Ferreira<sup>2</sup>, Cleiton Lourenço Oliveira<sup>1</sup>, Charles Neris  
Moreira<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal de Lavras, Departamento de Fitopatologia, CEP 37200-000, Caixa Postal 3037, Lavras, MG, e-mail: rejanercosta@yahoo.com.br

<sup>2</sup>COOPERBATATA, Vargem Grande do Sul.

Autora para correspondência: Rejane Rodrigues da Costa

---

Costa, R. R., Figueira, A. R., Camargos, V. N., Ferreira, A., Oliveira, C. L.,  
Moreira, C. N. Caracterização Molecular de um Novo isolado de *Potato vírus Y*  
(PVY). *Tropical Plant Pathology* .

## CARACTERIZAÇÃO BIOLÓGICA E MOLECULAR DE TRÊS ISOLADOS ATÍPICOS DE *POTATO VÍRUS Y* (PVY)

### RESUMO

Neste trabalho foram estudados três isolados do *Potato virus Y* (PVY), coletados em Minas Gerais (PVY-AGA) e em São Paulo (PVY-AST e PVY-MONA), apresentando sintomas de topo crespo. Inicialmente as suas propriedades biológicas foram investigadas inoculando-se mecanicamente 14 espécies pertencentes às famílias *Amaranthaceae*, *Chenopodiaceae* e *Solanaceae*. Em seguida foram analisadas as suas características moleculares, empregando-se um conjunto de *primers* específicos, para diferenciação de estirpes por RT-PCR, e amplificando-se o gene de suas capas protéicas para posterior seqüenciamento e análise de nucleotídeos e aminoácidos. Dentre as plantas inoculadas mecanicamente, as de *Chenopodium quinoa*, *C. amaranticolor*, *Gomphereha globosa*, *Datura stramonium*, *Nicandra physaloides* e as de pimentão (*Capsicum anuum*) cv. Florida VR2 não apresentaram sintomas nem foram ELISA positivas, comportando-se como imunes aos três isolados. O isolado PVY-AGA foi o mais agressivo, induzindo mosaico severo em *Physalis floridana*, *Nicotiana glutinosa*, *N. rústica* e *N. tabacum* cvs. Havana, Turkish, Turkish NN e White burley, enquanto que os outros dois isolados induziram apenas mosaico intermediário nessas mesmas plantas. As cultivares de fumo Turkish, Turkish NN e White burley foram as plantas com maior suscetibilidade ao PVY-AGA, pois além de mosaico severo, apresentaram necrose severa nas nervuras, nanismo e morte das folhas mais velhas. As cultivares de pimentão Yolo Y e Bastidon foram menos suscetíveis e não apresentaram reações diferenciadas, reagindo com mosaico intermediário aos três isolados. O conjunto de *primers* empregado amplificou uma banda com 609 pb, característica da estirpe necrótica do PVY, variante PVY<sup>NTN</sup>, para os três isolados estudados. As identidades de nucleotídeos entre os três isolados estudados foram iguais, ou seja, de 96%. Por outro lado, a identidade de aminoácidos foi igual a 96% apenas entre o isolado PVY-AGA e o PVY-MON, pois a identidade entre os isolados PVY-AST e PVY-MON foi de 95% e a entre o PVY-AGA e o PVY-AST foi de 94%. Quando comparados com os demais isolados do GenBank, as maiores identidades de nucleotídeos foram com os isolados da China e dos Estados Unidos, enquanto que a maior identidade de aminoácidos (98%) foi mantida apenas entre o isolado PVY-AGA e o DDQ157180 dos Estados Unidos, denominado de NE-11. A árvore filogenética construída com base nos nucleotídeos mostrou que os isolados se separaram em dois grandes grupos, tendo os isolados brasileiros ficado no segundo grupo, com os isolados PVY-MON e PVY-AST se agrupando em um clado e o PVY-AGA em outro, próximo ao DQ157180. Na árvore baseada na seqüência de

aminoácidos, os três isolados se separaram em clados diferentes, mas os isolados PVY-AGA e O DQ157180 mantiveram certa proximidade, indicando uma provável origem comum. O PVY-AST se comportou como um provável ancestral comum para todos os demais isolados de PVY utilizados nessa análise.

**Palavras-chave adicionais:** Ágata, Monalisa, Asterix, NE-11, PVY<sup>NTN</sup>

## BIOLOGICAL AND MOLECULAR CHARACTERIZATION OF THREE ATYPICAL ISOLATES OF *Potato virus Y* (PVY).

### ABSTRACT

In this work three viral isolates of *Potato virus Y* (PVY), collected in Minas Gerais (PVY-AGA) and São Paulo (PVY-AST and PVY-MONA), were studied, showing potato curly top. First of all, their biological properties were determined through mechanical inoculation in 14 plant species belonging to three families: *Amaranthaceae*, *Chenopodiaceae* and *Solanaceae*. Afterwards, RT-PCR was used with different sets of specific primers in order to identify their PVY strain and to amplify the coat protein gene for sequencing and analysis. Among the inoculated plants, *Chenopodium quinoa*, *C. amaranticolor*, *Gompherena globosa*, *Datura stramonium*, *Nicandra physaloides* and *Capsicum anuum* cv. Florida VR2 did not show any symptoms and were DAS-ELISA negative, behaving as immune to the three PVY isolates. The isolate named PVY-AGA was the more aggressive, inducing severe mosaic in *Physalis floridana*, *Nicotiana glutinosa*, *N. rústica* and *N. tabacum* cvs. Havana, Turkish, Turkish NN and White Burley. When infected with the two other isolates these plants showed only mild mosaic. The tobacco cultivars, Turkish, Turkish NN and White burley were the most susceptible, showing also vein necrosis, dwarfing and death of old leaves. The *C. anuum* cultivars, Yolo Y and Bastidon were less susceptible and did not show different reactions, reacting with mild mosaic when infected with the three isolates. The set of primers used allowed the amplification of a 609 pb fragment, typical of necrotic PVY strain, which causes necrotic rings in potato tubers, named PVY<sup>NTN</sup>. The nucleotide identity among the three isolates was the same, equal to 96%. However, the identity of amino acids was 96% only between PVY-AGA and PVY-MON, because the identity between PVY-AST and PVY-MON was 95% and between PVY-AGA and PVY-AST was 94%. When compared with the isolates from GenBank the highest nucleotide identities were with the PVY isolates from China and United States but the highest amino acid identity (98%) was maintained only between the PVY-AGA and DDQ157180, from United States, named NE-11. The phylogenetic tree based on nucleotide sequence showed that the PVY isolates were clustered in two major groups, with two subgroups. The Brazilian isolates were located in the same group but the

isolates PVY-MON e PVY- AST were located in one subgroup and the PVY-AGA in another one, close to DQ15718 American isolate. In the phylogenetic tree based on amino acid sequence, the three Brazilian isolates were located separately but the PVY-AGA and the DQ157180 maintained certain proximity, showing a probable similar origin. The isolate PVY-AST behaved as a common ancestor for all the PVY isolates used in this analysis.

**Keywords:** Ágata, Monalisa, Asterix, NE-11, PVY<sup>NTN</sup>

## INTRODUÇÃO

Dentre os principais vírus que afetam a cultura de batata no Brasil, o vírus do enrolamento da folha da batata ("*Potato leafroll virus*" - PLRV), o vírus Y da batata ("*Potato vírus Y- PVY*" - PVY) e os latentes vírus X ("*Potato vírus X*" - PVX), e o vírus S ("*Potato vírus S*" - PVS) merecem destaque (Salas & Feres, 2004). Durante muitos anos o PLRV foi o principal vírus responsável pela degenerescência das batatas produzidas em território nacional (Cupertino & Costa, 1970; Figueira 1995; Souza Dias, 1996). Entretanto, o PVY se tornou o mais importante vírus do Brasil a partir de 1994, com a introdução de estirpes mais agressivas, através de sementes importadas (Figueira & Pinto, 1995; Souza Dias, 1995; Figueira et al., 1996; Moraes et al., 1997). Dessa forma, nos dias atuais o PVY tem sido mais importante que o PLRV (Souza Dias, 1995; Figueira, 1999; Camargo et al., 2007; Rabelo Filho, 2008), levando à infecções que chegam a quase 100% no Brasil, variando conforme a estirpe, cultivar, idade da planta infectada e das condições ambientais (Souza Dias, 2001).

O PVY pertence ao gênero *Potyvirus*, família *Potiviridae* e tem sido classificado em três principais estirpes: PVY<sup>O</sup> (estirpe comum) que causa mosaico sistêmico, PVY<sup>N</sup> (estirpe necrótica) que causa mosaico e necrose nas nervuras de plantas de fumo (*Nicotiana tabacum* L.) e PVY<sup>C</sup> (estirpe clorótica) que induz sintomas do tipo "stipple streak", em algumas cultivares de batata que possuem o gene *Nc* (De Bokx & Huttinga, 1981; Singh et al., 2008), sendo estas, as estirpes mais comumente encontradas no Brasil e no mundo. Entretanto, diversos variantes genéticos dessas estirpes, que surgiram de variantes da PVY<sup>N</sup> ou de recombinações entre a necrótica (PVY<sup>N</sup>) e a comum (PVY<sup>O</sup>), como a chamada de N:O ou Wilga, têm sido descritos (Beczner, 1984; Chrzanowska, 1991; Le Romancer et al., 1994; Nie & Singh, 2003; Chikh Ali et al., 2007; Lorenzen et al., 2008; Ogawa et al., 2008). Uma variante da estirpe PVY<sup>N</sup>, que



causa anéis necróticos nos tubérculos de algumas cultivares de batata, denominada de PVY<sup>NTN</sup> (*Potato tuber necrotic ringspot disease* – PTNRD), chegou recentemente ao Brasil e desde então tem sido rapidamente disseminada (Souza Dias et al., 1999; Inoue-Nagata *et al.*, 2001; Rabelo Filho, 2008). Devido a essa grande variabilidade, frequentemente aparecem novos isolados, tornando a sua correta caracterização, uma tarefa bastante difícil.

Para a identificação e caracterização das diferentes estirpes/isolados de PVY, geralmente são empregadas três principais técnicas: a biológica, com a utilização de plantas indicadoras (Matthews, 1993); a sorologia, utilizando-se anticorpos monoclonais (Matthews, 1991; Shukla *et al.*, 1994) e a molecular, como a RT-PCR utilizando primers para regiões específicas do genoma e o seqüenciamento genético de regiões específicas como a da capa protéica e a região 5'UTR (Glais et al., 2002; Lorenzen et al., 2006; 2008).

A utilização de anticorpos policlonais, apesar de muito úteis para a identificação do PVY, não permite a diferenciação das estirpes e de variantes genéticas, uma vez que os anticorpos policlonais reagem positivamente para todas as estirpes não permitindo a diferenciação entre as mesmas (Chikh Ali et al., 2007), sendo a RT-PCR a ferramenta mais eficiente, por se basear em regiões específicas do genoma, que são diferentes entre os isolados (Boonham et al., 2002; Singh et al., 2008; Lorenzen et al., 2006, 2008).

Nesse trabalho, três isolados virais, infectando as cultivares de batata Asterix e Monalisa, de Vargem Grande do Sul e a cv. Ágata de Ipuiuna, foram coletados e estudados. Esses isolados tinham em comum o fato de terem sido diagnosticados por DAS-ELISA como pertencentes ao PVY e causarem sintomas severos nas plantas, caracterizados por nanismo, drástica diminuição da área foliar e encrespamento da planta, principalmente dos folíolos mais jovens, que se mostravam enrolados e com mosaico. Sintomas semelhantes em plantas de batata, já haviam sido descritos por Souza-Dias et al. (2006), sendo

denominados de topo crespo. Esses isolados foram inoculados em plantas indicadoras e caracterizados empregando-se os primers descritos por Boonham et al. (2002). Além disso, o fragmento genômico referente às suas capas protéicas foi amplificado e estudado.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Manutenção do inoculo e caracterização biológica**

Inicialmente os isolados de Vargem Grande do Sul-SP, denominados de PVY-AST e PVY-MON, e o de Ipuiuna-MG, denominado de PVY-AGA, foram submetidos ao teste DAS-ELISA, para diagnose do PLRV, PVX, PVS e PVY, empregando-se anticorpos policlonais da Bioreba, com o procedimento recomendado pelo fabricante. Como as plantas foram trazidas dos campos, essas foram plantadas em vasos para obtenção dos tubérculos, que têm sido re-multiplicados para manutenção do inoculo original. Além disso, foram inoculadas em plantas de fumo cv. TNN e as folhas foram desidratadas e guardadas a -20 e a -80<sup>0</sup>C.

A caracterização biológica foi feita por inoculação mecânica em 14 espécies de plantas indicadoras: *Nicotiana tabacum* cv. White Burley, *Nicotiana tabacum* cv. 'TNN', *Nicotiana tabacum* cv. Havana, *Nicotiana tabacum* cv. Turkish, *Nicotiana rústica*, *Nicotiana glutinosa*, *Physalis floridan*, *Datura stramonium*, *Capysicum annum* cv. Florida VR-2, *Capysicum annum* cv. Bastidon e *Capysicum annum* cv. Yolo Y da família Solanaceae; *Chenopodium amaranticolor*, *Chenopodium quinoa* Willd. da família *Chenopodiaceae* e *Ghophrena globosa* da família *Amaranthaceae*). Essas plantas foram semeadas em bandejas e posteriormente transplantadas para vasos de 2Kg, tendo sido inoculadas no estagio de 3 a 4 folhas, dependendo da espécie. As folhas a serem

inoculadas foram polvilhadas com carborundum 400 mesh e inoculadas com extratos obtidos de folhas de fumo infectadas com os três diferentes isolados (macerados em almofariz, na presença de tampão fosfato 0,01M pH7, acrescido de sulfito de sódio na mesma molaridade), que foram posteriormente lavados em água corrente. Essas plantas foram mantidas na casa de vegetação até a avaliação final dos sintomas.

### **Caracterização da estirpe, seqüenciamento e análise da capa protéica**

#### **Discriminação e identificação dos isolados por RT-PCR**

Para a diferenciação entre os isolados foi empregada a combinação de *primers* descrita por Booham et al. (2002). Esses *primers* estão discriminados na Tabela 1.

**Tabela 1-** Primers utilizados na detecção e diferenciação de estirpes do (PVY), Lavras-MG, 2008.

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

#### **Extração do RNA total dos isolados de PVY**

A extração do RNA seguiu o protocolo do método de Trizol, a partir de folhas jovens de plantas de fumo infectadas, que apresentavam os sintomas característicos do PVY. Primeiramente as folhas 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 ultra pura), na proporção de 1 g/5mL. Logo após, os microtubos foram incubados em

banho-maria por 5 minutos, à 60°C, e centrifugados a 12.000 rpm por 10 minutos a 4°C. O precipitado obtido foi descartado, adicionando-se 300µl de clorofórmio a cada microtubo, agitado no vórtex e deixado à temperatura ambiente por 3 minutos. Em seguida os microtubos foram centrifugados novamente a 12.000 rpm por 10 minutos a 4°C e a fase aquosa obtida foi transferida para outro microtubo, adicionando-se a mesma metade do seu volume de isopropanol e 0,8M de Citrato de sódio/1,2M de NaCl, misturando-se posteriormente por inversão dos tubos cuidadosamente, deixando-os à temperatura ambiente por 10 minutos para que haja a precipitação do RNA. Passados esse tempo, os microtubos foram centrifugados a 12.000 rpm, 4°C por 10 minutos, descartando-se posteriormente o sobrenadante. O precipitado foi lavado com etanol 70% gelado, centrifugados a 12.000 rpm, 4°C por 10 minutos, descartado o sobrenadante e secado a vácuo, onde o pellet obtido foi ressuscitado em 25µL de água ultrapura tratada com dietilpirocarbonato (DEPC). O RNA total extraído foi analisado em gel de agarose a 0,7%.

#### **Síntese do cDNA**

A transcrição reversa foi feita empregando-se 2 µL do tampão AMV-RT; 4 µL de MgCl<sub>2</sub>; 2 µL de dNTPs 10mM; 0,8µl de AMV-RT; 1 µL do Primer O-9295-R e 5 µL do RNA total extraído. Os tubos foram incubados a 42<sup>o</sup>C por 60 minutos e em seguida a 95°C por 5 minutos, e colocados imediatamente em recipiente com gelo.

#### **Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)**

Na reação de PCR, foram utilizados 5 µL de tampão PCR, 1,5 µL de MgCl<sub>2</sub> (25 mM), 0,5 µL de dNTPs 10 mM, 1,25 µL do *primer* O-9295-R, 1,25 µL do *primer* O-8687-F, 1,25 µL do primer N-8687-F, 0,25 µL da enzima Go Taq DNA polimerase( Promega), 2 µL do cDNA, completando-se o volume para 25

μL com água ultrapura tratada com DEPC. A desnaturação inicial foi a 94° C por 2 minutos, seguida por 30 ciclos: desnaturação a 94° C por 1 minuto, anelamento a 65°C por 1 minuto e alongação a 72°C por 2 minutos. A alongação final foi a 72°C por 10 minutos e os produtos obtidos dessa reação de amplificação do DNA foram então analisados em gel de agarose a 0,7% corado com GelRed Nucleic Acid Gel Stain .

### **Amplificação e seqüenciamento do gene da capa protéica por RT-PCR**

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

Y-8549-F: GCGATACTTATGAAGTGCACC

Y-9397-R: CGTCCGGAGGAGCACTAC

A reação de RT-PCR foi feita conforme descrito acima, e o DNA foi purificado a partir do gel de poliacrilamida, empregando-se o Kit “Perfect Prep® Gel Cleanup - Eppendorf”. O seqüenciamento dos isolados foi realizado no Laboratório de Sequenciamento de DNA da EMBRAPA de Sete Lagoas. As seqüências obtidas 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, 19 isolados de PVY disponíveis no “GenBank” (Tabela 3). As árvores filogenéticas foram obtidas por meio do programa MEGA 4.0 ([www.megasoftware.net](http://www.megasoftware.net)) com bootstrap, considerando valores superiores a 2.000 repetições. As seqüências obtidas foram comparadas com outras 18 seqüências de PVY disponíveis no GenBank (Tabela 2).

**TABELA 2:** Relação dos isolados de *Potato virus Y* (PVY), obtidos no GenBank (National Center for Biotechnology Information - NCBI, 2008), empregados para comparação com os isolados estudados.

<b>ACESSO</b>	<b>ORIGEM</b>	<b>ESTIRPE</b>	<b>AUTORES/PUBLICAÇÃO</b>
<b>DQ157180</b>	USA	PVY <sup>N</sup>	Piche et al. (2004)
<b>AM236796</b>	China	*PVY	Tian et al. (Não publicado)
<b>AM236799</b>	China	*PVY	Tian et al. (Não publicado)
<b>AY 841267</b>	China	*PVY	Na, L. (Não publicado)
<b>AY841258</b>	China	*PVY	Na, L. (Não publicado)
<b>AB331547</b>	Japão	PVY <sup>NTN</sup>	Ogawa et al. (2008)
<b>AB331545</b>	Japão	PVY <sup>NTN</sup>	Ogawa et al. (2008)
<b>AB331518</b>	Japão	PVY <sup>NTN</sup>	Ogawa et al. (2008)
<b>AM268435</b>	Alemanha	PVY <sup>N</sup>	Schubert et al. (2007)
<b>AJ390298</b>	Reino Unido	PVY <sup>NTN</sup>	Boonham et al. (2002)
<b>AY742731</b>	China	PVY	Na, L. (Não publicado)
<b>AJ890345</b>	Alemanha	*PVY <sup>NTN</sup>	Schubert et al. (2007)
<b>AY742727</b>	China	PVY	Na, L. (Não publicado)
<b>AB256029</b>	Japão	*PVY	Chikh Ali et al. (2007)
<b>EF016294</b>	Inglaterra	PVY <sup>NTN</sup>	Gow et al. (Não publicado)
<b>AJ890343</b>	Alemanha	PVY <sup>NTN</sup>	Schubert et al. (2007)
<b>EU182576</b>	China	PVY <sup>N</sup>	Wen et al. (2007)
<b>X97895</b>	Suíça	PVY <sup>N</sup>	Jakab et al. (2005)

\* Estirpe não especificada no GenBank

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Todos os isolados estudados foram ELISA positivos para o PVY e negativos para os demais vírus pesquisados. Os resultados da inoculação dos isolados nas diversas espécies de plantas estão discriminados na Tabela 3. As espécies de *C. quinoa*, *C. amaranticolor*, *D. stramonium* e *G. globosa* se comportaram como imunes a todos os isolados de PVY, confirmando os estudos realizados por outros autores (De Bokx & Huttinga, 1981, Le Romancer et al., 1994; Rabelo Filho, 2008). A cultivar de pimentão, Florida VR2, também se comportou como imune aos três isolados de PVY em estudo. Entretanto, nas cultivares de pimentões Bastidon e Yolo Y foram observados sintomas de mosaico, como já descrito por Le Romancer et al. (1994). Esses autores relataram que a variante PVY<sup>NTN</sup> se diferenciou dos demais isolados, não somente por induzir a formação de anéis necróticos nos tubérculos, mas também, pela sua capacidade de infectar pimentão e algumas cultivares de fumo e tomate.

As cultivares de fumo, *Nicotiana tabacum* cv. Havana e *N. rústica* induziram sintomas de mosaico severo para o isolado PVY-AGA e intermediário para os isolados PVY-MON e PVY-AST. Porém, *N. glutinosa* apresentou mosaico intermediário para todos os isolados, evoluindo para pontos cloróticos locais intermediários, exceto o isolado PVY-AGA que obteve sintomas severos, onde esses sintomas são característicos da estirpe PVY<sup>N</sup> e de sua variante PVY<sup>NTN</sup> (Le Romancer et al., 1994). As espécies de fumos White Burley, Turkish e Turkish NN reagiram com clorose e mosaicos severos quando inoculados com o isolado PVY-AGA, e com mosaico e clorose mais brandos para os demais isolados.

O uso dos primers, descritos por Boonham et al. (2002), na discriminação dos isolados, permitiram a amplificação de uma banda de 609pb (Figura 1), típica da estirpe necrótica (PVY<sup>N</sup>), variante NTN (PVY<sup>NTN</sup>).

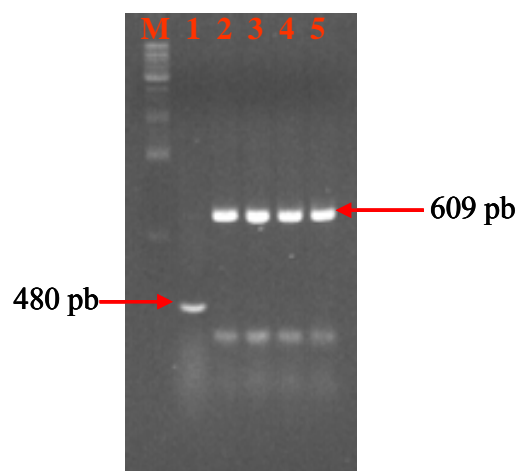


**TABELA 3:** Plantas indicadoras utilizadas no teste de gama de hospedeiras.

PLANTAS INDICADORAS	ISOLADOS		
	PVY-AGA	PVY-MON	PVY-AST
<i>Chenopodium quinoa</i> Willd.	SS	SS	SS
<i>Chenopodium amaranticolor</i>	SS	SS	SS
<i>Ghophrena globosa</i>	SS	SS	SS
<i>Datura stramonium</i>	SS	SS	SS
<i>Capysicum annum</i> cv. Florida VR-2	SS	SS	SS
<i>Capysicum annum</i> cv. Bastidon	M+	M+	M+
<i>Capysicum annum</i> cv. Yolo Y	M+	M+	M+
<i>Physalis floridana</i>	M++, EM+, SB	M+, EM+, SB	M+, EM+, SB
<i>Nicotiana tabacum</i> cv. 'TNN'	M++, NN, PCL++, SB, DF	M+, NN, PCL+, SB, DF	M+, NN, PCL+, SB, DF
<i>Nicotiana tabacum</i> cv. White Burley	M++, NN, PCL++, SB, DF	M+, NN, PCL+, SB, DF	M+, NN, PCL+, SB, DF
<i>Nicotiana tabacum</i> cv. Turkish	M++, NN, PCL++, SB, DF	M+, NN, PCL+, SB, DF	M+, NN, PCL+, SB, DF
<i>Nicotiana glutinosa</i>	M, PCL++	M, PCL+	M, PCL+
<i>Nicotiana tabacum</i> cv. Havana	M++	M	M
<i>Nicotiana rústica</i>	M++	M	M

SS=sem sintomas, M=mosaico, EM= embolhamento, SB=subdesenvolvimento da planta, NN= necrose das nervuras, PCL= pontos cloróticos locais, DF= desfolha

Sintomas: (sem sinal) sintomas fracos, (+) sintomas intermediários, (++) sintomas severos



**FIGURA 1.** Análise eletroforética das bandas amplificadas com os *primers* de Boonham et al. (2002). M: 1Kb ladder; 1: controle PVY<sup>N</sup>; 2: controle PVY<sup>NTN</sup>; de 3 a 5: isolados (PVY-AGA, PVY-AST e PVY-MON respectivamente).

Com o par de *primers* desenhado, foi possível amplificar um fragmento de 849 pb, que foi posteriormente seqüenciado e analisado. O alinhamento múltiplo de nucleotídeos revelou que os três isolados apresentaram identidades iguais entre si, de 96% (Tabela 4). Comparando-se esses isolados com os demais isolados do GenBank, descritos na tabela 2. O isolado PVY-AGA apresentou altas identidades (98%) com o isolado DQ157180, dos Estados Unidos, e com os três isolados da China, AM236796, AM236799 e A841267, enquanto que a maior identidade entre os outros dois e os isolados do GenBank isolados foi de 96%.

A menor identidade do PVY-AGA foi de 92%, com o isolado AJ890343, que é um isolado do tipo PVY<sup>NTN</sup> da Alemanha, e a menor do PVY-AST e do PVY-MON foi de 93% com os isolados AB256029 do Japão e o AJ890343 da Alemanha respectivamente.

**TABELA 4:** Porcentagem de identidade na seqüência de nucleotídeos do gene da capa protéica entre os três isolados estudados em comparação com a seqüência de outros dezoito isolados de PVY depositados no GenBank.

	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	X97895
<b>1 - PVY-ÁGA</b>	96	96	98	98	98	98	97	94	94	94	94	94	97	93	97	93	93	92	95	94
<b>2 - PVY-AST</b>	.	96	96	96	96	96	96	94	94	94	94	94	96	94	96	93	94	93	94	94
<b>3 - PVY-MON</b>	.	.	96	96	96	96	96	95	95	95	94	95	96	95	96	95	95	95	95	95
<b>4 - DQ157180</b>	.	.	.	99	99	99	99	94	94	94	94	95	99	93	99	93	93	93	95	95
<b>5 - AM236796</b>	.	.	.	.	99	99	99	94	94	94	94	94	99	93	99	92	92	92	94	94
<b>6- AM236799</b>	.	.	.	.	.	99	99	94	94	94	94	94	99	93	99	92	92	92	94	94
<b>7 - A 841267</b>	.	.	.	.	.	.	99	94	94	94	94	94	99	93	99	93	93	92	94	94
<b>8 - AY841258</b>	.	.	.	.	.	.	.	94	94	94	94	94	99	93	99	92	92	92	94	94
<b>9 - AB331547</b>	.	.	.	.	.	.	.	.	100	100	98	99	93	97	93	97	97	96	98	98
<b>10 - AB331545</b>	.	.	.	.	.	.	.	.	.	100	98	99	93	97	93	97	97	96	98	98
<b>11 - AB331518</b>	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	98	99	93	97	93	97	97	96	98	98
<b>12 - AM268435</b>	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	98	93	97	93	97	97	97	99	99
<b>13 - AJ390298</b>	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	94	96	94	96	96	96	98	98
<b>14 - AY742731</b>	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	92	100	92	92	92	94	94
<b>15 - AJ890345</b>	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	92	99	99	99	97	97
<b>16 - AY742727</b>	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	92	92	92	94	94
<b>17 - AB256029</b>	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	99	98	97	97
<b>18 - EF016294</b>	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	99	97	97
<b>19 - AJ890343</b>	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	97	97
<b>20 -EU182576</b>	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	99

**TABELA 5:** Porcentagem de identidade na seqüência de aminoácidos do gene da capa protéica entre os três isolados estudados em comparação com a seqüência de outros dezoito isolados de PVY depositados no GenBank.

	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	X97895	
<b>1 - PVY-ÁGA</b>	94	96	98	97	97	97	97	97	97	97	96	97	97	97	97	97	97	96	97	97	
<b>2 - PVY-AST</b>	.	95	95	95	95	95	95	95	95	95	94	95	95	95	95	95	95	95	95	95	
<b>3 - PVY-MON</b>	.	.	97	97	98	97	97	97	97	97	96	97	97	97	97	97	97	96	97	97	
<b>4 - DQ157180</b>	.	.	.	99	99	99	99	98	98	98	98	99	99	98	99	98	98	98	99	99	
<b>5 - AM236796</b>	.	.	.	.	99	98	98	98	98	98	97	98	98	98	98	98	97	97	98	98	
<b>6 - AM236799</b>	.	.	.	.	.	99	98	98	98	98	97	98	98	98	98	97	97	97	98	98	
<b>7 - A 841267</b>	.	.	.	.	.	.	99	98	98	98	97	98	99	98	99	98	98	97	98	98	
<b>8 - AY841258</b>	.	.	.	.	.	.	.	98	98	98	97	98	99	98	99	97	97	97	98	98	
<b>9 - AB331547</b>	.	.	.	.	.	.	.	.	100	100	98	99	98	99	98	98	98	98	99	98	
<b>10 - AB331545</b>	.	.	.	.	.	.	.	.	.	100	98	99	98	99	98	98	98	98	99	98	
<b>11 - AB331518</b>	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	98	99	98	99	98	98	98	98	99	98	
<b>12 - AM268435</b>	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	98	97	98	97	98	98	97	98	98	
<b>13 - AJ390298</b>	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	98	99	98	99	99	98	100	99	
<b>14 - AY742731</b>	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	98	100	97	97	97	98	98	
<b>15 - AJ890345</b>	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	98	98	98	98	99	98	
<b>16 - AY742727</b>	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	97	97	97	98	98	
<b>17 - AB256029</b>	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	98	98	99	98	
<b>18 - EF016294</b>	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	98	99	98	
<b>19 - AJ890343</b>	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	98	98	
<b>20 - EU182576</b>	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	99

A menor identidade entre os isolados do GenBank foi de 92, principalmente entre o isolado AJ890343 (PVY<sup>NTN</sup>), da Alemanha, e outros isolados da mesma variante, provenientes da China. Alguns isolados japoneses, de PNTDR apresentaram 100% de identidade entre si, tanto para nucleotídeos quanto para aminoácidos, como no caso do AB331547 com os isolados AB331545 e AB331518; e entre os isolados AY742731 e AY742727. O mesmo não aconteceu entre os três isolados brasileiros que, como já foi dito, apresentou identidade de 96%, mostrando uma baixa homogeneidade entre eles.

Comparando-se a identidade dos aminoácidos (tabela 5) dos 3 isolados estudados, a identidades se mantiveram iguais a 96% apenas entre o PVY-AGA e o PVY-MON mostrando que a substituição dos nucleotídeos não resultaram na mudança também de aminoácidos, tendo sido do tipo de substituição não sinônima ou silenciosa (Nei & Gojobori, 1986). O mesmo não aconteceu com os outros dois isolados, PVY-AST e PVY-MON, nos quais a identidade baixou para 95%, e para 94% entre o PVY-AGA e o PVY-AST respectivamente.

Em relação aos demais isolados do GenBank, o PVY-AGA continuou com a identidade de 98% com o isolado DQ157180 e a identidade entre O PVY-MON e o isolado chinês AM236799 subiu para 98%. A identidade do PVY-AST aumentou ou diminuiu conforme o isolado, ficando entre 94 e 95%. Considerando-se os demais isolados, a identidade entre o AJ390298 da Inglaterra e o AJ890343 da Alemanha aumentou para 100%, mostrando que a substituição de nucleotídeos foi do tipo silencioso.

De qualquer modo, esperava-se que os três isolados de PVY estudados, pela similaridade de sintomas em batata, apresentassem alta similaridade entre si. Mas, quando foram inoculados em cultivares de fumo, o isolado PVY-AGA foi mais severo que os outros dois, mostrando já a diversidade de propriedades biológicas entre eles. Entretanto, na discriminação por meio dos primers de Booham et al. (2002), os três se

comportaram como PVY<sup>NTN</sup>. Nota-se portanto, que existe uma diversidade nesses isolados, mesmo dentro das estirpes e de suas variantes.

Nie & Singh (2003) observaram que os isolados do tipo PNTDR da América do Norte, eram diferentes dos descritos da Europa. Segundo eles, esses isolados se originaram por mutação ao invés de recombinação entre as estirpes PVY<sup>o</sup> e PVY<sup>N</sup>. Em 2004, Piche et al. estudaram um isolado de PVY<sup>NTN</sup> de Nebraska, Estados Unidos, e o denominaram de NE-11. Naquela época, os autores estudaram os isolados com base apenas nos produtos amplificados por PCR, empregando primers específicos para as diferentes estirpes, descritos por Nie & Singh (2002, 2003). Recentemente, Lorenzen et al. (2008) voltou a estudar esse isolado, fazendo o seu seqüenciamento genético completo. Eles concluíram que esse era um novo genótipo molecular de PVY, previamente classificado erroneamente como isolado tipo PNTDR dos Estados Unidos (PVY<sup>NA-NTN</sup>). A sua seqüência completa foi quase idêntica aos isolados de PVY<sup>N</sup> nos primeiros 2000 nucleotídeos, mas se assemelhou aos isolados de PVY<sup>NA-NTN</sup> nos 600 nt seguintes e, nos últimos 7000 nts, compartilhou identidade intermediária com PVY<sup>N</sup> e PVY<sup>NA-NTN</sup>. Segundo esse autor, o genoma desta variante de PVY contém pelo menos três junções de recombinação. Esse autor desenhou um par de primers para amplificar parte da região da capa protéica (NE\_8049F: GCGTTCCTTTGTTAATGGCGAC; NE\_9026R: GCATTTTCAACAATCGGCTTGA), iniciando nos nucleotídeos 8049 (primer forward: 8049 – 8069), um pouco antes do gene da capa protéica, que corresponde aos nucleotídeos 8571 a 9371, e um primer antisenso na posição 9025 (reverse: 9004 – 9025) considerado o genoma total do PVY, e do nucleotídeo 434 ao 455 se considerados apenas os do gene da capa protéica. Comparando-se com os demais isolados, nota-se que nessa região houve duas substituições de A por G (438 e 441) e uma de G por A (450). Nessa região, todos os isolados estudados compartilham os mesmos nucleotídeos, mostrando que, se esses primers fossem empregados, provavelmente todos os três isolados seriam amplificados (Figura 2). Entretanto, como não se

conhece a região entre os nucleotídeos 8049 a 8069, não se pode afirmar definitivamente antes de se testar o primer senso.

Por outro lado, se for analisada a região contendo os nucleotídeos 601 a 660 (Figura 3) pode-se observar que apenas o isolado PVY-AGA possui A no nucleotídeos 633, como o isolado NE-11. Os dois últimos isolados possuem um G nessa posição e ainda o PVY-MON possui também um G no lugar do A na posição 612. Entretanto, nenhuma dessas substituições significa mudança de aminoácidos, se tratando, portanto, de uma substituição sinônima. Souza Dias (não publicado) ressaltou que o isolado por ele estudado, denominado de PVY<sup>NCURL</sup>, teria uma Adenina no lugar da Guanina, na posição 9204 do genoma (Figura 3). Dentre os isolados aqui estudados, apenas o PVY-AGA apresentou essa característica, que também foi observada no NE-11, isolado aqui denominado de DQ157180. Essa substituição também não significa mudança no aminoácido codificado. Como se pode observar, a grande variabilidade apresentada pelos isolados torna difícil a caracterização dos mesmos.

**Figura 2:** Alinhamento múltiplo dos isolados da região 401 a 480 do genoma.

```

AB331545      ATCGAATACCCACTGAAACCAATCGTTGAGAATGCAAAACCAACACTTAGGCAAATCATG 480
AB331518      ATCGAATACCCACTGAAACCAATCGTTGAGAATGCAAAACCAACACTTAGGCAAATCATG 480
AB331547      ATCGAATACCCACTGAAACCAATCGTTGAGAATGCAAAACCAACACTTAGGCAAATCATG 480
AJ390298      GTCGAATACCCACTGAAACCAATCGTTGAGAATGCAAAACCAACACTTAGGCAAATCATG 480
AM268435      GTCGAATACCCACTGAAACCAATCGTTGAGAATGCAAAACCAACACTTAGGCAAATCATG 480
X97895        GTCGAATACCCACTGAAACCAATCGTTGAGAATGCAAAACCAACACTTAGGCAAATCATG 480
EU182576      GTCGAATACCCACTGAAACCAATCGTTGAGAATGCAAAACCAACACTTAGGCAAATCATG 480
EF016294      GTCGAATACCCACTGAAACCAATCGTTGAGAATGCAAAACCAACACTTAGGCAAATCATG 480
AJ890343      GTCGAATACCCACTGAAACCAATCGTTGAGAATGCAAAACCAACACTTAGGCAAATCATG 480
AJ890345      GTCGAATACCCACTGAAACCAATCGTTGAGAATGCAAAACCAACACTTAGGCAAATCATG 480
AB256029      GTCGAATACCCACTGAAACCAATCGTTGAGAATGCAAAACCAACACTTAGGCAAATCATG 480
AM236796      GTTGAATACCCACTCAAGCCGATTGTTGAAAATGCAAAACCAACCCTTAGGCAAATTATG 480
AM236799      GTTGAATACCCACTCAAGCCGATTGTTGAAAATGCAAAACCAACCCTTAGGCAAATTATG 480
AY742731      GTTGAATACCCACTCAAGCCGATTGTTGAAAATGCAAAACCAACCCTTAGGCAAATTATG 480
AY742727      GTTGAATACCCACTCAAGCCGATTGTTGAAAATGCAAAACCAACCCTTAGGCAAATTATG 480
AY841258      GTTGAATACCCACTCAAGCCGATTGTTGAAAATGCAAAACCAACCCTTAGGCAAATTATG 480
AY841267      GTTGAATACCCACTCAAGCCGATTGTTGAAAATGCAAAACCAACCCTTAGGCAAATTATG 480
DQ157180      GTTGAATACCCACTCAAGCCGATTGTTGAAAATGCAAAACCAACCCTTAGGCAAATTATG 480
PVY-AGA       GTTGAATACCCACTCAAGCCGATTGTTGAAAATGCAAAACCAACCCTTAGGCAAATCATG 480
PVY-AST       GTCGAATACCCACTCAAGCCGATTGTTGAAAATGCAAAACCAACCCTTAGGCAAATCATG 480
PVY-MON       GTTGAATACCCACTCAAGCCGATTGTTGAAAATGCAAAACCAACACTTAGGCAAATCATG 480
* * * * *

```



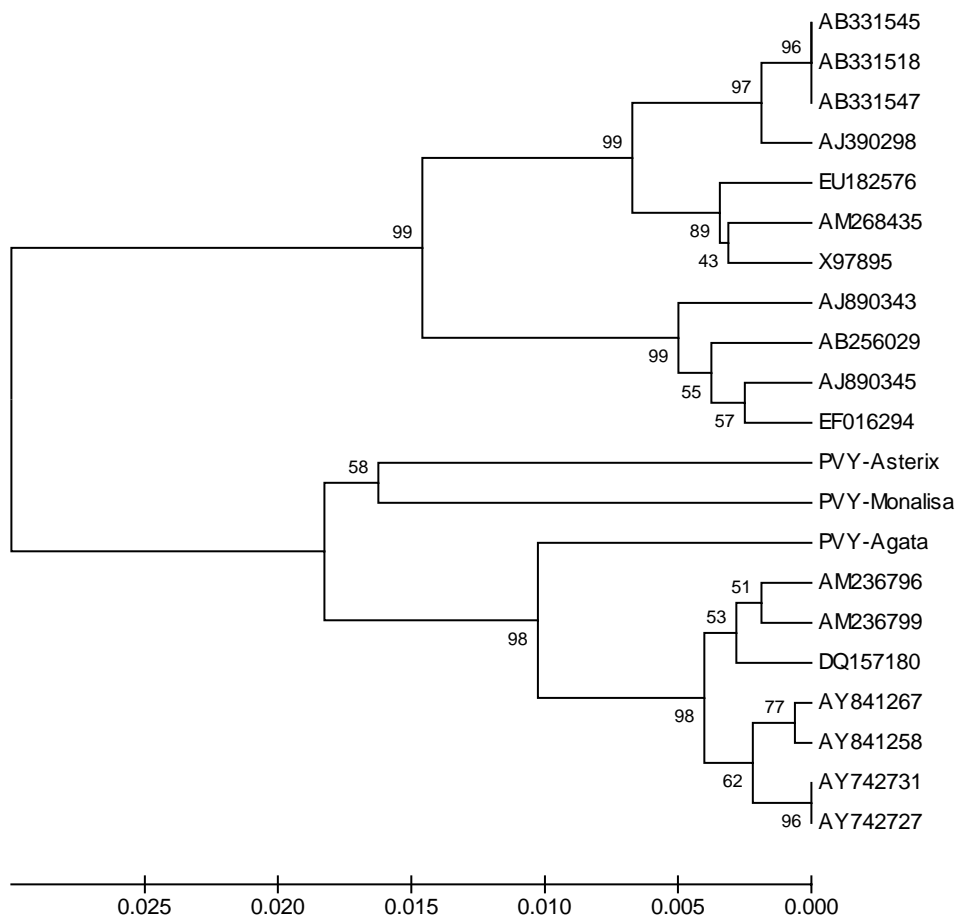
**Figura 3:** Alinhamento múltiplo dos isolados da região 601 a 660 do genoma.

```

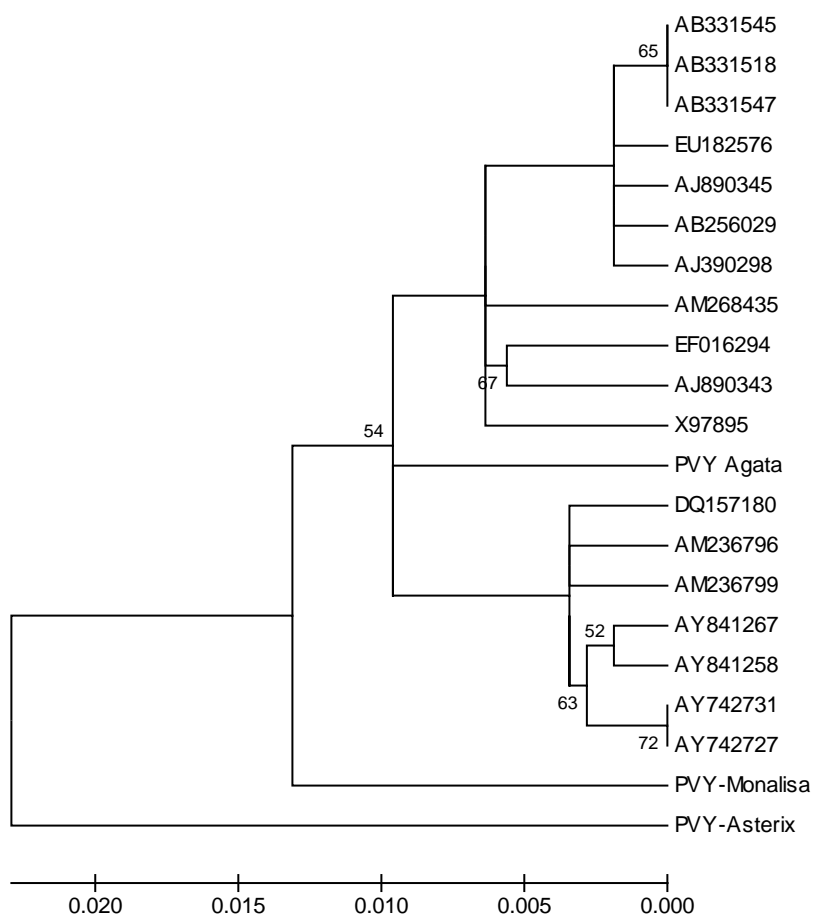
AB331545      GACTTTTATGAAGTTACATCACGGACACCAAGTGAGGGCTAGAGAGGCACACATTCAAATG 660
AB331518      GACTTTTATGAAGTTACATCACGGACACCAAGTGAGGGCTAGAGAGGCACACATTCAAATG 660
AB331547      GACTTTTATGAAGTTACATCACGGACACCAAGTGAGGGCTAGAGAGGCACACATTCAAATG 660
AJ390298      GACTTTTATGAAGTTACATCACGGACACCAAGTGAGGGCTAGAGAGGCACACATTCAAATG 660
AM268435      GACTTTTATGAAGTTACATCACGGACACCAAGTGAGGGCTAGAGAGGCACACATTCAAATG 660
X97895        GACTTTTATGAAGTTACATCACGGACACCAAGTGAGGGCTAGAGAGGCACACATTCAAATG 660
EU182576      GACTTTTATGAAGTTACATCACGGACACCAAGTGAGGGCTAGAGAGGCACACATTCAAATG 660
EF016294      GACTTTTATGAGGTCACATCACGAACACCAAGTGAGGGCTAGGGAAGCGCACATTCAAATG 660
AJ890343      GACTTTTATGAGGTCACATCACGAACACCAAGTGAGGGCTAGGGAAGCGCACATTCAAATG 660
AJ890345      GACTTTTATGAGGTCACATCACGAACACCAAGTGAGGGCTAGGGAAGCGCACATTCAAATG 660
AB256029      GACTTTTATGAGGTCACATCACGAACACCAAGTGAGGGCTAGGGAAGCGCACATTCAAATG 660
AM236796      GACTTTTATGAAGTTACATCACGTACACCAAGTAAGGGCTAGAGAGGCACACATTCAAATG 660
AM236799      GACTTTTATGAAGTTACATCACGTACACCAAGTAAGGGCTAGAGAGGCACACATTCAAATG 660
AY742731      GACTTTTATGAAGTTACATCACGTACACCAAGTAAGGGCTAGAGAGGCACACATACAAATG 660
AY742727      GACTTTTATGAAGTTACATCACGTACACCAAGTAAGGGCTAGAGAGGCACACATACAAATG 660
AY841258      GACTTTTATGAAGTTACATCACGTACACCAAGTAAGGGCTAGAGAGGCACACATTCAAATG 660
AY841267      GACTTTTATGAAGTTACATCACGTACACCAAGTAAGGGCTAGAGAGGCACACATTCAAATG 660
DQ157180      GACTTTTATGAAGTTACATCACGTACACCAAGTAAGGGCTAGAGAGGCACACATTCAAATG 660
PVY-AGA       GACTTTTATGAAGTTACATCACGTACACCAAGTAAGGGCTAGAGAGGCACACATTCAAATG 660
PVY-AST       GACTTTTATGAAAGTTCACATCACGTACACCAAGTGAGGGCTAGAGAGGCACACATTCAAATG 660
PVY-MON       GACTTTTATGAGGTCACATCACGTACACCAAGTGAGGGCTAGGGAAGGCACACATTCAAATG 660
***** ** ***** ***** ***** ** ** ***** *****

```

Na árvore filogenética construída com base nos nucleotídeos (Figura 4), os isolados se separaram em dois grandes grupos, com os isolados brasileiros no segundo grupo, porém em clados diferentes, ficando o PVY-AGA separado dos dois outros e mais próximo do isolado NE-11. Na árvore baseada na seqüência de aminoácidos os isolados se separaram em mais grupos, e os três isolados brasileiros ficaram separados. Foi interessante notar que o genoma do isolado PVY-AST, com base nessa árvore, parece ter um genoma semelhante ao que seria o ancestral de todos os demais isolados. De qualquer modo, é possível inferir que os isolados brasileiros devem ter sido originados das mesmas regiões que os isolados chineses e americanos, semelhantes ao isolado NE-11.



**Figura 4-**Árvore Filogenética construída com base na seqüência de nucleotídeos do fragmento estudado. Os valores do bootstrap foram obtidos pelo programa MEGA eUPGMA, com 2.000 repetições.



**Figura 5-**Árvore Filogenética construída com base na seqüência de aminoácidos do fragmento estudado. Os valores do bootstrap foram obtidos pelo programa MEGA e Neighbor Joining, com 2.000 repetições.

## CONCLUSÕES

1. Todos os três isolados estudados pertencem à estirpe necrótica do *Potato vírus Y* (PVY), variante PVY<sup>NTN</sup>.
2. O isolado PVY-AGA foi o mais agressivo dos três estudados, induzindo mosaico necrotico severo nas plantas de *Physalis floridana*, *Nicotiana glutinosa*, *N. rústica* e *N. tabacum* cvs. Havana, Turkish, Turkish NN e White burley, sendo que as três ultimas foram as mais suscetíveis, apresentando também nanismo, necrose severa e morte das folhas mais velhas.
3. Os três isolados estudados apresentaram maior identidade com os isolados chineses AM236796, AM236799 e A841267 e com o isolado americano DQ157180.
3. A identidade de nucleotídeos e de aminoácidos do PVY-AGA foi maior (98%) com o isolado americano DQ157180, denominado de NE-11, e a identidade de aminoácidos do PVY-MON foi maior (98%) com o isolado AM236799 da China, indicando uma provável origem geográfica comum.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BEZNER, L.; HORVATH, J.; ROMHANYI, I.; FORSTER, H. Studies on the etiology of tuber necrotic ringspot disease in potato. **Potato Research**, Wageningen, v. 27, p. 339–352. 1984.

BOOHAM, N; PRESTON, K. W. S; NORTH, J; SMITH, P; BARKER, I. The detection of tuber necrotic isolate of *Potato virus Y*, and the accurate discrimination of PVY<sup>O</sup>, PVY<sup>N</sup> and PVY<sup>C</sup> strains using RT-PCR. **Journal of Virological Methods**, v. 102, n.1/2, p.103-112, Apr. 2002.

CAMARGOS, V. N.; FIGUEIRA, A. R.; PEREIRA, S. L.; MOREIRA, C. N.; RAMALHO, T. O. Caracterização biológica de isolados de *Potato vírus Y* (PVY) que induzem necrose superficial em tubérculos de batata. In: ENCONTRO NACIONAL DE PRODUÇÃO E ABASTECIMENTO DA BATATA, 8., ; SEMINÁRIO NACIONAL DE BATATA SEMENTE, 9., 2007, Holambra,SP. **Anais...** Holambra, 2007.

CHIKH ALI, M. ; MAOKA, T.; NATSUAKI, K. T. A point mutation changes the serotype of Potato virus Y isolate : 10 R. P. Singh et al. genomic determination of the serotype of PVY strains. **Virus Genes**, v. 35, p. 359–367, 2007.

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

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

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

DE BOKX, J. A.; HUTTINGA, H. Potato vírus Y. **Descriptions of Plant Viruses**, n. 242, 1981.

FIGUEIRA, A. R.; MORAES, F. R. ; PINTO, A. C. S. New PVY necrotic strain is causing great losses in Brazil. In: APS MEETING, 1996, Indianópolis. **Abstracts...** Indianópolis, Indiana, 1996. 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. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 20, p. 299, 1995.

FIGUEIRA, A. R. Víruses da batata e suas implicações na produção de batata-semente no estado de Minas Gerais: histórico do problema e soluções. **Summa Phytopatologica**, Piracicaba, v. 21, n. 3/4, p. 268-269, 1995.

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

INOUE-NAGATA, A. K.; FONSECA, L. T. T. A.; ÁVILA, A. C. de. ; MONTE, D. C. Analysis of the nucleotide sequence of the coat protein and 3'-untranslated region of two brazilian *Potato virus Y* isolates. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 26, n. 1, p. 45-52, mar. 2001.

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.

LORENZEN, J. H. ; PICHE, L. M. ; GUDMESTAD, N. C. ; MEACHAM, T. ; SHIEL, P. A multiplex PCR assay to characterize Potato virus Y isolates and identify strain mixtures. **Plant Disease**, v. 90, p. 935-940, 2006.

LORENZEN, J.; NOLTE, P.; MARTIN, D.; PASCHE, J. S.; GUDMESTAD, N. C. NE-11 represents a new strain variant class of Potato virus Y. **Archives Virology**, v. 153, p. 517-525, 2008.

MATTHEWS, R. E. F. **Plant Virology**. 4. ed. San Diego: Academic, 1991. 1001. p.

MATTHEWS, R. E. F. **Plant virology**. 4. ed. San Diego: Academic, 1993. p.443-444.

MORAES, F. H. R; FIGUEIRA, A . R; SANTOS, R. C Caracterização da nova estirpe necrótica do vírus Y da batata. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 22, p. 339, 1997.

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. **Core nucleotide**. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=nucore>> Acesso em 26 maio 2008

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

NIE, X. ; SINGH, R. P. Probable geographical grouping of PVYN and PVYNTN based on sequence variation in P1 and 50UTR of genome and methods for differentiating North American PVYNTN. **Journal of Virological Methods**, v. 101, n. 1/2, p. 145–1562, Mar. 2002.

NIE, X. ; SINGH, R. P. ; SINGH, M. Molecular and pathological characterization of N : o isolates of the Potato virus Y from Manitoba, Canada. **Canadian Journal Plant Pathology**, v. 26, p. 573–583, 2004

NIE, X.; SINGH, R. P. Specific differentiation of recombinant PVYN : o and PVYNTN isolates by multiplex RT-PCR. **Journal of Virological Methods** , v. 113, n. 2, p. 69–77, Nov. 2003.

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**, v. 131, n. 2, p.199-212, 2008.

RABELO FILHO, F. A. C. **Caracterização biológica e molecular de isolados de *Potato virus Y* (PVY) em Minas Gerais e verificação de resíduos em tubérculos de batata quando feito o controle do inseto**



**vetor**. 2008. 103 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

SALAS, F. J. S.; FERES, A. Resistência de variedades comerciais de batata a transmissão do *Potato virus Y* pelo vetor *Myzus persicae*. **Instituto Biológico**, São Paulo, v. 71, n. 2, p. 167-173, 2004.

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

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. de. Novo desafio : evidências apontam para a presença de um estirpe exótica do PVY em lavouras de batata Monalisa na região de Casa Branca, São Paulo. **Cultivar Pelotas**, v. 6, n. 36, p. 12-16, 2006.

SOUZA-DIAS, J. A. C. de ; SILVA FILHO, H. M. ; GRANJA, N. P. ; HAYASHI, P. C. . Novas observações sobre a putativa raça NTN do vírus Y da batata (PVY<sup>NTN</sup>), causadora de anéis necróticos superficiais nos tubérculos. In: CONGRESSO PAULISTA DE FITOPATOLOGIA, 22., 1999, Jaboticabal,SP. **Anais....** Jaboticabal, SP, 1999. v. 25, p. 36-36.

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 da batata (PVY) e a questão da variante NTN. **Batata Show**, v. 1, n. 2; p. 16-21, 2001.

SOUZA DIAS, J. A. C. Viroses da batata e suas implicações na produção de batata-semente no Estado de São Paulo. **Summa Phytopatologica**, Piracicaba, n. 21, p. 264-266, 1995.