

ADRIANA ARAÚJO COSTA TRUTA

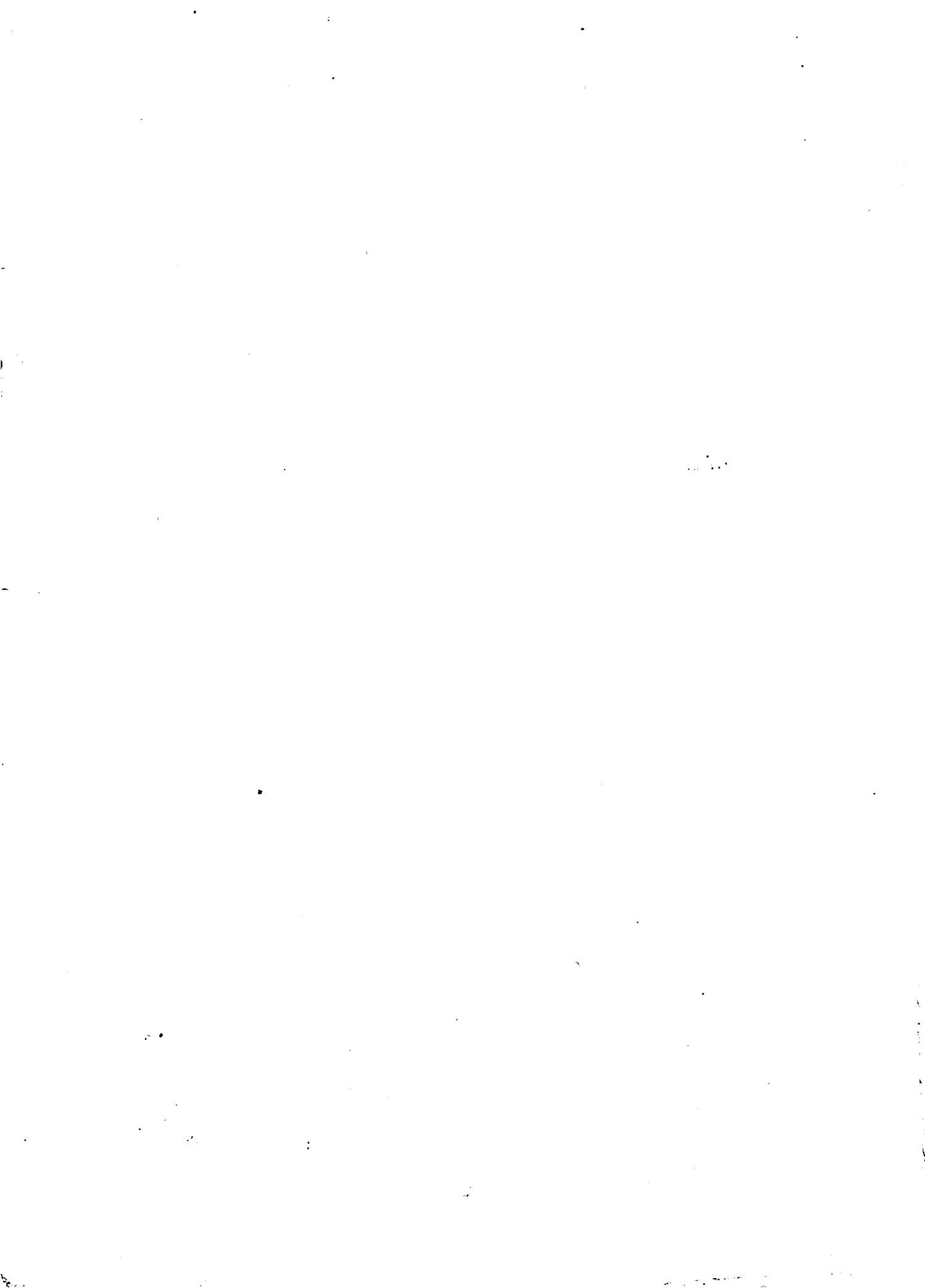
DETECÇÃO SIMULTÂNEA DE VÍRUS EM BATATA (*SOLANUM TUBEROSUM* L.) POR  
DAS-ELISA E DETERMINAÇÃO DO MATERIAL VEGETAL IDEAL A SER UTILIZADO  
NOS PROGRAMAS DE INDEXAÇÃO

Dissertação apresentada a Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Curso de Mestrado em Agronomia, área de concentração em Fitopatologia, para obtenção do título de "Mestre".

**Orientador**

Prof. Antônia dos Reis Figueira

LAVRAS  
MINAS GERAIS-BRASIL  
1997



ADRIANA ARAÚJO COSTA TRUTA

DETECÇÃO SIMULTÂNEA DE VÍRUS EM BATATA (*SOLANUM TUBEROSUM* L.) POR  
DAS-ELISA E DETERMINAÇÃO DO MATERIAL VEGETAL IDEAL A SER UTILIZADO  
NOS PROGRAMAS DE INDEXAÇÃO

Dissertação apresentada a Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Curso de Mestrado em Agronomia, área de concentração em Fitopatologia, para obtenção do título de "Mestre".

**Orientador**

Prof. Antônia dos Reis Figueira

Ficha Catalográfica preparada pela Seção de Classificação e catalogação  
da Biblioteca Central da UFLA

Truta, Adriana Araújo Costa.

Detecção simultânea de vírus em batata (*Solanum tuberosum* L.) por  
DAS-ELISA e determinação do material vegetal ideal a ser utilizado nos  
programas de indexação / Adriana Araújo Costa Truta. – Lavras : UFLA,  
1997.

58 P. : IL.

Orientador: Antônia dos Reis Figueira.

Dissertação (Mestrado) - UFLA.

Bibliografia.

1. Batata semente - vírus. 2. Indexação. 3. Doença. 4. ELISA. I.  
Universidade Federal de Lavras. II Título.

CDD-635.2198

ADRIANA ARAÚJO COSTA TRUTA


DETECÇÃO SIMULTÂNEA DE VÍRUS EM BATATA (*SOLANUM TUBEROSUM* L.) POR  
DAS-ELISA E DETERMINAÇÃO DO MATERIAL VEGETAL IDEAL A SER UTILIZADO  
NOS PROGRAMAS DE INDEXAÇÃO

Dissertação apresentada a Universidade Federal  
de Lavras, como parte das exigências do Curso de  
Mestrado em Agronomia, área de concentração  
em Fitopatologia, para obtenção do título de  
"Mestre".

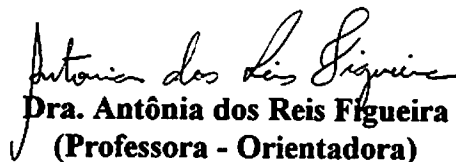
APROVADA em 29 de agosto de 1997



Dr. Francisco Murilo Zerbini Jr.



Dr. Hilário Antônio de Castro



Dra. Antônia dos Reis Figueira  
(Professora - Orientadora)

Aos meus pais e irmãos.

OFEREÇO

“Somos simplesmente investigadores, com um propósito sério e uma mente não preconceituosa, que estudam todas as coisas, experimentam todas as coisas e atêm-se aquilo que é bom... Nós buscamos, inquirimos, não rejeitamos nada sem razão, não aceitamos nada sem provas: nós somos estudantes e não instrutores.”

Henry S. Olcott.

## AGRADECIMENTOS

A UFLA (Universidade Federal de Lavras);

A Capes, pela concessão da bolsa de estudos;

A orientadora - Prof. Antonia dos Reis Figueira pela amizade e estímulo na realização desse trabalho;

Aos membros da banca : Prof. Hílário Antônio de Castro e Prof. Francisco Murilo Zerbini Jr. pela valiosa contribuição.

Ao Prof. Egberto Araújo pela amizade e estímulo.

Aos colegas do Centro de Indexação de Batata-semente Eliana, Carlos, Antônio Carlos, Augusto, pela amizade e apoio nas diversas fases desse trabalho.

Aos colegas Eneida, Flávio, Tião, Leimi, Sônia, Bárbara, Arnaldo, Jair, Alvanir e Silvia, Wirton, Flávio, Gislaine, Robério, Vespasiano, Luciana, Rosângela, Alessandra, Kátia, Jacson, Tânia, Mônica, Célia, Carlos, Otiniel, Kely, Sílvia, Vilma, Mônica, Maristela pela amizade, ajuda e compreensão durante toda as fases do Curso.

A todos que contribuíram anonimamente para a realização desse trabalho.

## SUMÁRIO

	Página
LISTA DE TABELAS.....	vi
LISTA DE FIGURAS.....	viii
RESUMO.....	ix
ABSTRACT.....	xi
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	5
2.1 PLRV.....	6
2.1.1 Caracterização e Sintomatologia.....	6
2.2 PVY.....	8
2.2.1 Caracterização e Sintomatologia.....	8
2.3 PVX.....	10
2.3.1 Caracterização e sintomatologia.....	10
2.4 Resistência de Plantas maduras.....	11
2.5 Métodos de Controle.....	13



2.6 Programas de Certificação.....	14
2.7 Principais Técnicas de diagnose.....	16
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>18</b>
3.1 Diagnose simultânea dos vírus X, Y e do PLRV.....	19
3.2 Multiplicação do PVY e do PLRV em plantas de batata.....	22
3.3 Eficiência do teste serológico DAS-ELISA para detecção de vírus em hastes no final do ciclo e em diferentes partes dos respectivos tubérculos.....	22
3.4 Avaliação dos Resultados.....	23
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>25</b>
4.1 Diagnose simultânea dos vírus X, Y e do PLRV.....	25
4.2 Multiplicação do PVY e do PLRV em plantas de batata inoculadas no início do ciclo.....	29
4.3 Eficiência do teste serológico DAS-ELISA para detectar de vírus em hastes no final do ciclo e em seus respectivos tubérculos e plântulas.....	31
<b>5 CONCLUSÕES.....</b>	<b>44</b>
<b>6 REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>46</b>
<b>7 ANEXO.....</b>	<b>54</b>
<b>8 APÊNDICE.....</b>	<b>57</b>

**LISTA DE TABELAS**

	Página
TABELA 1 Detecção simultânea de vírus pela técnica DAS-ELISA, em extratos de folhas de plantas indicadoras, utilizando-se diferentes volumes e diferentes combinações de antígenos e de antissoros.....	26
TABELA 2 Detecção simultânea de vírus, pela técnica DAS-ELISA, em extratos de plantas de batata cv. Achat infectadas com um ou mais vírus, utilizando-se diferentes combinações de antígenos e antissoros.....	28
TABELA 3 Resultado da diagnose do PVY e do PLRV pela técnica DAS-ELISA, em hastes, no final do ciclo, de plantas de batata cv. Achat inoculadas aos 15 dias pós-emergência, e respectivos tubérculos e plântulas.....	33
TABELA 4 Resultado da diagnose do PVY e do PLRV pela técnica DAS-ELISA, em hastes no final do ciclo, de plantas de batata cv. Achat inoculadas aos 45 dias pós-emergência, e respectivos tubérculos e plântulas.....	34

<b>TABELA 5</b> Resultado da diagnose do PVY, pela técnica DAS-ELISA, nos tubérculos e respectivas plântulas provenientes de cada uma das plantas de batata cv. Achat infectadas, inoculadas aos 15 dias do ciclo vegetativo.....	<b>39</b>
<b>TABELA 6</b> Resultado da diagnose do PVY, pela técnica DAS-ELISA, nos tubérculos e respectivas plântulas provenientes de cada uma das plantas de batata cv. Achat infectadas, inoculadas aos 45 dias do ciclo vegetativo.....	<b>40</b>
<b>TABELA 7</b> Resultado da diagnose do PLRV, pela técnica DAS-ELISA, nos tubérculos e respectivas plântulas provenientes de cada uma das plantas de batata cv. Achat infectadas, inoculadas aos 15 dias do ciclo vegetativo.....	<b>41</b>
<b>TABELA 8</b> Resultado da diagnose do PLRV, pela técnica DAS-ELISA, nos tubérculos e respectivas plântulas provenientes de cada uma das plantas de batata cv. Achat infectadas, inoculadas aos 45 dias do ciclo vegetativo.....	<b>42</b>

**LISTA DE FIGURAS**

	<b>Página</b>
<b>FIGURA 1</b> Concentração PVY e do PLRV ao longo do ciclo de plantas de batata inoculadas aos 15 dias pós-emergência...	29
<b>FIGURA2</b> Detecção de vírus em hastes, no final do ciclo, de plantas infectadas com PVY, que foram inoculadas aos 15 e 45 dias pós-emergência, e seus respectivos tubérculos e plântulas.....	35
<b>FIGURA 3</b> Detecção de vírus em hastes, no final do ciclo, de plantas infectadas com PVY, que foram inoculadas aos 15 e 45 dias pós-emergência, e seus respectivos tubérculos e plântulas.....	35

## RESUMO

TRUTA, Adriana Araújo Costa. Determinação de parâmetros ligados à detecção dos principais vírus em batata, visando otimizar a técnica DAS-ELISA para a indexação de vírus em tubérculos-semente. Lavras, UFLA. (Mestrado em Fitopatologia)\*

Neste trabalho investigou-se a possibilidade de se efetuar a diagnose simultânea, através da técnica DAS-ELISA, dos principais vírus que afetam a batata nas condições brasileiras, utilizando-se uma mistura de antissoros e plantas infectadas com um ou mais vírus. Foram testadas combinações de antissoros nas concentrações finais de 1:5000 e 1:2500 e volumes de antígenos/antissoros de 50, 100 e 150  $\mu$ l/orifício para diagnose do PVX, PVY e PLRV, isoladamente, combinados dois a dois ou a três, simultaneamente. Foram utilizados extratos de folhas de batata da cultivar Achat e extrato das plantas indicadoras: *Gomphrena globosa* L., para o PVX, *Nicotiana tabacum* L. para o PVY e *Physalis floridiana* Rydb. para o PLRV, em duas diluições: 1:80 para todos os vírus e

soluções mais diluídas, sendo: 1:160 para o PLRV, 1: 640 para o PVY, 1:1280 para o PVX. Foi possível a detecção de todos os vírus em todas as combinações de antissoros e antígenos testados, bem como em todos os volumes antígeno/antissoro utilizados.

Outro parâmetro investigado foi a multiplicação do PLRV e do PVY em plantas de batata da cultivar Achat, inoculadas aos 15 dias pós-emergência e testadas aos 15, 30 e 45 dias após a inoculação. Verificou-se que o PVY apresentou uma taxa de multiplicação maior que a do PLRV em todas as fases testadas.

Foi verificada a sensibilidade e eficiência da técnica ELISA para a detecção dos vírus estudados em hastes no final do ciclo e tubérculos antes da brotação, brotos e plântulas oriundos das plantas inoculadas aos 15 e 45 dias após a emergência. Foi possível a detecção do PVY e PLRV em hastes no final do ciclo, brotos e plântulas nas duas fases do ciclo analisadas. Não foi detectado o PVY em nenhum dos tubérculos testados, antes da brotação, nas plantas inoculadas com PVY nas duas fases do ciclo. O PLRV foi detectado em 27,5 % dos tubérculos antes da brotação, produzidos por plantas inoculadas aos 15 dias pós-emergência, mas não em tubérculos produzidos por plantas inoculadas aos 45 dias pós-emergência.

Entre as diversas partes da planta analisadas, a que apresentou melhores resultados foi o broto, por atender às maiores exigências do teste, que é rapidez entre a colheita e análise e a ocorrência do mínimo de escape possível.

\*Orientadora: Antonia dos Reis Figueira. Membros da banca: Francisco Murilo Zerbini Jr. e Hilário Antônio de Castro.

## ABSTRACT

### **Optimization of DAS-ELISA technique for the detection of potato (*Solanum tuberosum L*) viruses in tubers seed .**

In this study was investigated the efficiency of DAS-ELISA technique to perform the simultaneous diagnosis of PLRV, PVY and PVX in mixed virus infected plants, using a mixture of antiserum to detect virus in potato. The tested antiserum dilutions were 1:5000 and 1:2500 and the volume of antigen/antiserum were 50, 100 and 150  $\mu$ l/well. The antigens were used alone or in combinations of two or three viruses, extracted from infected potato leaves, c.v. Achat, and from the following indicator plants: *Gomphrena globosa* L. (PVX), *Nicotiana tabacum* L. (PVY) and *Physalis floridiana* Rydb. (PLRV). The DAS-ELISA tests were carried out with two antigen dilutions for each virus. The first was 1:80 for all the viruses and the second varied with end point dilution of each antigen, for the detection by serological technique: 1:160 for PLRV, 1:640 for PVY and 1:1280 for

PVX infected plants. The results showed that all three viruses could be detected in every test performed.

The virus multiplication rate was investigated in potato plants cv. Achat, inoculated separately with PVY and PLRV, 15 days after plant emergence, and tested by DAS-ELISA at 15, 30, and 45 days after inoculation. This rate was clearly greater in PVY than in PLRV infected potato plants, in all plant ages tested.

The efficiency of DAS-ELISA for the detection of PVY and PLRV in stems at the end of potato plant life cycle, in dormant tubers, sprouts and in seedlings of potato plants inoculated at 15 and 45 days after plant emergence, was also investigated. The PVY and PLRV were detected in stems, sprouts and seedlings from potato plants inoculated in both life cycle stages. However the PVY could not be detected in dormant tubers from plants inoculated after 15 or 45 days after emergence. PLRV was detected in 27,5% of the dormant tubers from plants inoculated at 15 days but not in dormant tubers from plants inoculated at 45 days after plant emergence.

The sprouts were found to be the best material to be submitted to virus indexation tests, in official certification programns, because of the short time between seed harvesting and comercialization required for the potato growers.



## 1 INTRODUÇÃO

A batata ( *Solanum tuberosum* L. ) ocupa o 4º lugar entre os principais alimentos produzidos no mundo, desempenhando relevante papel na alimentação humana (FAO, 1994). É cultivada no Brasil, em praticamente todos os Estados e em diferentes épocas do ano; porém a maioria das cultivares exploradas é suscetível a viroses.

Devido ao modo de multiplicação comercial empregado na cultura da batata, ou seja, através do uso de tubérculos-semente, as doenças de natureza virótica tornam-se muito importantes. Estas viroses podem ser veiculadas através desses tubérculos, o que representa um risco em potencial, pois em alguns casos, uma incidência mínima de vírus no campo pode ser suficiente para causar uma infecção generalizada (Cupertino e Costa, 1970; De Bokx e Van der Want, 1987). Conseqüentemente, o emprego dos mesmos em plantios sucessivos resulta num acúmulo de viroses nos tubérculos produzidos que, com

o decorrer do tempo, conduz à degenerescência, chegando algumas vezes a inviabilizar a cultura.

Os vírus mais freqüentemente relacionados com a degenerescência de tubérculos-mente no Brasil são o do enrolamento da folha (Potato Leafroll Vírus- PLRV ), vírus Y ( Potato Virus Y - PVY ) e o vírus X ( Potato Virus X - PVX ) da batata, que podem causar prejuízos variáveis, dependendo da introdução e disseminação das viroses no campo, pois, uma vez iniciada a infecção, os vírus geralmente chegam aos tubérculos (infecção primária). As perdas provocadas por esta infecção vão depender da idade da planta por ocasião da inoculação, uma vez que, quanto mais cedo ocorre a infecção, maiores chances tem os vírus de chegarem aos tubérculos, já que plantas maduras exibem uma certa resistência. Porém, o grande problema é quando os tubérculos portadores de vírus são utilizados como batata-semente para um próximo plantio, perpetuando a virose e originando plantas infectadas (infecção secundária) . Esse tipo de infecção geralmente causa perdas significativas, que são registradas em termos de redução em número e peso dos tubérculos. O PLRV pode reduzir a produção em até 80 % , o PVY em 50 % e o PVX pode provocar perdas que variam de 8 a 20 %. (Mallozzi, 1982).

A seleção de material de plantio livre de vírus, é uma medida capaz de minimizar os efeitos da degenerescência, o que pode ser implementado através dos programas de certificação de sementes. A multiplicação sucessiva de sementes básicas, sem perder a qualidade fitossanitária, constitui um dos principais objetivos dos programas de certificação, em cujas metas está o aumento da produtividade das lavouras. Nesses programas, são definidas várias medidas a fim de evitar a introdução e disseminação dos vírus na cultura, tais como o uso de material sadio, controle de vetores, inspeções visuais

no campo, que são complementadas pelos testes de laboratório, mediante amostragem e indexação dos tubérculos destinados a sementes (Mizubuti, 1981).

Os testes de indexação podem ser usados para determinar a incidência do PLRV, PVY e PVX em amostras de tubérculos coletadas em lotes representativos dos campos de produção de batata-semente. Os resultados obtidos são decisivos para a classificação das sementes, complementando as inspeções visuais, as quais, se realizadas isoladamente podem não corresponder à realidade, uma vez que diversas outras causas podem ser responsáveis por sintomas semelhantes àqueles induzidos por vírus, tais como deficiências nutricionais e fitotoxidade. (Mallozzi, 1982). Apesar dos programas de indexação de sementes já serem bastante antigos, só recentemente os resultados de inspeções de campo são complementados por testes de laboratório, com resultados mais eficientes.

Os testes mais antigos se baseavam na pré-cultura e no uso de plantas indicadoras, que tinham a desvantagem de demorar entre 30 e 55 dias para mostrarem resultados confiáveis. Atualmente, com o desenvolvimento da técnica serológica ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay), é possível a obtenção de resultados rápidos e precisos na detecção de vírus, mesmo na ausência de sintomas na planta hospedeira. (Salazar, 1993). Além disso, possui ainda uma série de outras vantagens em relação as técnicas tradicionais: maior sensibilidade, podendo ser realizada para um grande número de amostras ao mesmo tempo, não exigindo, para isto, equipamentos ou reagentes muito caros, bem como mão de obra especializada.

Apesar das inúmeras vantagens desta técnica a sua aplicação é relativamente recente, havendo ainda alguns aspectos a serem investigados para melhorar a sua

eficiência e racionalizar o seu uso. Neste trabalho foram feitos experimentos visando a sua otimização pela diagnose simultânea de vírus, com um máximo de economia de tempo e custo final da análise. Outro parâmetro investigado foi a sua sensibilidade e eficiência para detecção de vírus em hastes no final do ciclo e em tubérculos oriundos de plantas infectadas em diferentes fases do ciclo vegetativo. Os resultados obtidos nas investigações realizadas, são aqui apresentados e discutidos.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

A qualidade da batata semente é um fator de suma importância no rendimento da cultura, pois trata-se de uma planta de propagação vegetativa, através dos tubérculos, que são facilmente afetados por enfermidades fúngicas, bacterianas e principalmente viróticas. Essas doenças, transmitidas de geração à geração, tornam-se acumulativas, adquirindo um papel fundamental no processo de degenerescência da semente, o que afeta consideravelmente a produção no campo.

São as viroses, em grande parte, as responsáveis pela degenerescência da batata, sendo que os vírus mais freqüentemente relacionados com a degenerescência dos tubérculos são o PLRV, o PVY e o PVX.

## 2.1 PLRV

### 2.1.1 - Caracterização e Sintomatologia

O PLRV é um luteovírus, com partículas icosaédricas de 24 nm de diâmetro, contendo RNA de fita simples do tipo infeccioso. Tem uma gama restrita de hospedeiras, limitando-se praticamente à família Solanacea. A *Physalis floridana* Rydb e a *Datura stramonium* L. são boas hospedeiras experimentais, sendo bastante utilizadas como plantas indicadoras, bem como para multiplicação do vírus, apresentando como sintomas da infecção viral uma clorose internerval, bastante característica. Outras espécies de Solanáceas silvestres também são hospedeiras naturais do PLRV, como, por exemplo, *Solanum aculeatissimum* Jack; *S. lycocarpum* St. Hill.; *S. paniculatum* Hill., que constituem uma potencial fonte de vírus, aumentando assim a pressão de inóculo no campo (Souza Dias, Costa e Nardin, 1993). Além das solanáceas, algumas Amaranthaceas também são hospedeiras do PLRV (Hooker, 1981). Sua transmissão só é possível através de insetos vetores, dos quais o mais eficiente é o afídeo *Myzus persicae* Sulz., ou através de enxertia, apresentando replicação confinada aos tecidos do floema.

Este vírus é transmitido por afídeos de forma persistente e circulativa, isto é, depois que um afídeo se alimenta em uma planta infectada, pode transmitir o vírus por um período variável de 2 a 10 dias (Tamada e Harrison, 1981). Este tipo de transmissão exige uma maior especificidade vírus-vetor, iniciando pela aquisição do vírus através da seiva do floema, passagem deste através das paredes do intestino do inseto para a hemolinfa, e, em seguida, através dos acessórios glandulares, passando para o canal salivar, e finalmente a liberação das partículas virais, juntamente com a saliva, no floema

durante a alimentação. Esse tempo requerido para que as partículas de vírus se concentrem nas glândulas salivares e se tornem infectivas, é conhecido como período de latência, podendo durar de 8 a 24 horas. (De Bokx,1987; Tamada e Harrison, 1981; Rasgdale et al., 1994; Hooker, 1981).

Segundo Tamada e Harrison (1981), o conteúdo de PLRV adquirido pelo afídeo aumenta com o período de aquisição e decresce rapidamente após os afídeos serem removidos da fonte de vírus, e a concentração do vírus no *M. persicae* aumenta linearmente com o período de aquisição até cinco dias, mas alcança um platô após 7 dias.

Os sintomas apresentados pelas plantas de batata infectadas podem ser de dois tipos: primários e secundários. Os sintomas primários aparecem quando as plantas são infectadas durante a estação de plantio e se fazem mais evidentes nas folhas mais novas, as quais, geralmente, apresentam folíolos superiores mais eretos com ligeira descoloração. Além disso, esses folíolos são enrolados ventralmente e algumas vezes quebradiços, uma condição associada com o acúmulo de carboidratos, aparentemente causado por inibição da respiração e translocação. Porém, esses sintomas primários, incluindo cloroses e enrolamento das folhas, resultantes da transmissão por afídeos, freqüentemente não são visíveis quando a infecção ocorre no final da estação de cultivo, sendo a diagnose no campo praticamente impossível (Cupertino e Costa, 1970 b; Hooker, 1981; Beemster, 1987).

Sintomas secundários resultam de tubérculos infectados e são generalizados por toda a planta. As folhas se apresentam enroladas, principalmente as inferiores, a planta tem o seu crescimento retardado, internódios curtos e maior ramificação. Os tubérculos produzidos são em menor número, podendo apresentar uma necrose nos vasos próximos

ao estolão com subsequente redução na produção, o que os torna impróprios para o comércio (Tokeshi e Bergamin Filho, 1980; Hooker, 1981; Smith, 1981). Plantas severamente infectadas logo após a emergência geralmente apresentam sintomas semelhantes aos da infecção secundária (Souza Dias, amâncio e Costa 1990 a).

## 2.2 - PVY

### 2.2.1- Caracterização e Sintomatologia

O PVY é o membro tipo do grupo Potyvirus, apresenta-se em forma de longas partículas flexuosas com 730 x 11 nm , contendo RNA de fita simples, do tipo infeccioso. São conhecidas muitas estirpes, que são divididas em três grupos principais : PVY<sup>o</sup> (estirpe comum), PVY<sup>N</sup> (estirpe necrótica ) e o PVY<sup>c</sup> (estirpe que não é transmitida pelo inseto vetor). Estes são diferenciados pelos sintomas que causam em *Nicotiana tabacum* L., *P. floridana* e *Solanum tuberosum* L. (Smith 1981, De Bokx, 1987).

Este vírus é transmitido mecanicamente, através de enxertia, bem como por algumas espécies de afídeos, de forma não circulativa. Neste tipo de transmissão, o vírus é associado ao estilete, não ocorrendo replicação viral no vetor. A aquisição das partículas virais ocorre logo após alguns segundos de alimentação nos tecidos da epiderme da planta. Imediatamente após a aquisição, os afídeos estão aptos a transmitir o vírus (Tamada e Harrison, 1981; De Bokx, 1987; Bos, 1983). Porém os vírus não persistentes não são retidos após a ecdise, ou após poucas picadas de prova em plantas saudáveis. No entanto a transmissão não persistente por afídeos é um processo biológico um pouco mais complexo que simplesmente o processo mecânico, associado com a alimentação do inseto, sendo mais uma exceção que uma regra. Frequentemente fatores



ligados à proteína (fator Helper) que reconhecem sítios de ligação no vírus e no vetor são requeridos para o sucesso da transmissão. (Radclif, 1982; Tamada e Harrison, 1981).

O PVY infecta muitas espécies botânicas, especialmente da família Solanacea, onde se encontram hospedeiras naturais não cultivadas como a *P. floridana*, e ainda espécies cultivadas de grande importância econômica como tomate (*Lycopersicum sculentum* Mill.), pimentão (*Capsicum annum* L.) e fumo (*Nicotiana tabacum* L.). Entretanto, também nas famílias Chenopodiaceae e Leguminosae encontram-se algumas espécies hospedeiras. (Hooker, 1981; De Bokx, 1987. Mizubuti, 1981).

Os sintomas provocados pelo PVY variam de um mosaico quase imperceptível a severas necroses e morte prematura das plantas, dependendo do genótipo da cultivar e da estirpe do vírus, bem como de condições ambientais, assim como da presença de outros vírus, especialmente do vírus X, que influencia a severidade da expressão do PVY. Também as infecções tardias podem não apresentar sintomas. (Silberschidt e Kramer, 1942; Tokeshi e Bergamin Filho, 1980; Radcliffe, 1982; Hooker 1981).

Estudos recentes sobre a ocorrência e epidemiologia do PVY têm indicado que ele pode assumir um papel importante na degenerescência de batata semente, fator antes atribuído apenas ao PLRV. A detecção da ocorrência de uma nova estirpe do PVY<sup>N</sup>, na cultivar Achat, em lavouras de batata-semente no Estado de Minas Gerais, por Figueira e Pinto (1995), demonstrou que esta apresenta um comportamento diferente das detectadas anteriormente na região, sendo facilmente disseminada, podendo chegar a uma incidência de 50 % na segunda e até 80 a 90 % na terceira geração, o que pode significar uma redução de até 50 % na produção total. Esses dados refletem a

necessidade de medidas de controle efetivas para esta virose (Figueira, Pinto e Moraes, 1996).

## **2.3 - PVX**

### **2.3.1 - Caracterização e Sintomatologia**

O PVX é o membro tipo do grupo Potexvirus, apresentando partículas alongadas e flexuosas, com 515 x 13 nm contendo RNA de fita simples, do tipo infeccioso, e é facilmente transmitido por inoculação mecânica. Este vírus tem uma gama limitada de hospedeiros, restrito praticamente à família Solanaceae, onde geralmente produz sintomas sistêmicos, podendo também infectar Chenopodiaceas e Amarantaceas, nas quais induz sintomas locais. A espécie *Gomphrena globosa* é a hospedeira mais utilizada como planta indicadora, por apresentar lesões locais em forma de anéis com halo avermelhado, facilmente indentificáveis (Smith, 1981; Hooker 1981; De Boks e Van der Want, 1987).

Geralmente os sintomas apresentados por plantas de batata infectadas são latentes, razão pela qual esse vírus foi considerado como sendo inofensivo por muito tempo. Não induz sintomas nas folhagens, apenas uma ligeira redução no vigor da planta em comparação com plantas saudáveis, mas também pode induzir mosqueado leve a rugoso, com nanismo da planta. Alguns sintomas caracterizam-se por mosaico na parte apical, necrose das nervuras, rugosidade da lâmina foliar e nanismo (Faccioli, 1984; Hooker, 1981; Mizubuti, 1981; De Boks e Van der Want, 1987). Porém, segundo Beemster (1987), quando ocorre uma infecção tardia, ou seja quando plantas velhas são inoculadas, as partículas virais permanecem, por algum tempo, confinadas à folha

inoculada, não produzindo sintomas. Além disso, plantas de batata, ao alcançarem um certo estágio de desenvolvimento, não são mais infectadas com vírus, sendo esse fenômeno conhecido como resistência de plantas maduras.

Segundo Bradshaw e MacKay (1994), o nível de resistência também pode depender das condições sob as quais o vírus e a planta interagem, ou seja, temperatura, fonte de inóculo, cultivar e estágio de crescimento em que a planta é infectada.

No entanto, o PVX pode causar perdas que vão de 5 a 75 %, quando ele se associa ao PVY, provocando sintomas mais severos de mosaico rugoso, devido a uma ação sinérgica entre estes vírus, causando danos à cultura, que podem ser bastante drásticos (De Bokx e Van der Want, 1987; Mizubuti, 1981).

## **2.4 Resistência de Plantas Maduras**

A resistência de plantas maduras é um fenômeno que ocorre em plantas de batata infectadas tardiamente na estação de cultivo, com vírus como PVY, PVX e PLRV e outros, quando os tubérculos são menos afetados que plantas infectadas no início do cultivo. A resistência pode envolver a diminuição da proporção da replicação e translocação do vírus, pois a proporção de tubérculos sadios e infectados depende da inoculação em relação à idade da planta, bem como do período entre a inoculação e a colheita. No entanto a tentativa de associar o desenvolvimento da resistência em plantas maduras com alterações bioquímicas específicas não tem sido conclusiva. O conhecimento do desenvolvimento dessa resistência é economicamente importante, porque esta é uma parte essencial para uma previsão da disseminação do vírus em cultivos de batata semente, e porque as medidas para o controle da disseminação de viroses são

provavelmente mais efetivas se aplicadas quando as culturas estão mais suscetíveis (Beemster, 1987; Gibson, 1991; Sigvald, 1985 )

A maioria das cultivares de batata, até mesmo aquelas altamente suscetíveis ao PLRV, PVX e PVY, exibem plantas maduras resistentes, proporcionando uma menor disseminação do vírus em campos inoculados no final da estação de cultivo. As plantas inicialmente infectadas em um estágio maduro tendem a possuir menos tubérculos infectados. (Difonzo, Ragsdale e Radcliff, 1994; Sangar, Agrawal e Nagaich, 1988; Gibson, 1991)

No entanto, de acordo com Costa (1965), a batata permite uma fácil multiplicação dos pulgões e principalmente da espécie *M. persicae*, permitindo, assim, uma permanência desses vetores nos campos de produção, e, segundo Mallozzi (1984), os pulgões são também muito prejudiciais à cultura da batata, como praga. Em condições ambientais favoráveis, esses insetos têm intensa proliferação, aumentando rapidamente a disseminação de viroses e causando graves perdas na produção. Dadas as características de clima tropical e subtropical predominantes no país, os pulgões proliferam durante o ano todo, o que resulta em altas freqüências de infecção na cultura. Portanto, o conhecimento desses fatores, que interferem na incidência de viroses, é essencial para que se possam adotar medidas de controle, os quais, por sua vez, devem ter como objetivo não apenas evitar a introdução de viroses na cultura, mas também evitar a disseminação das mesmas (Shepard e Clafin, 1975; Weidemann, 1988).

## 2.5 Métodos de controle

O controle de viroses, devido ao grande número de fatores envolvidos no processo de infecção, envolve várias medidas, que devem ter caráter preventivo, as quais, se tomadas isoladamente, produzem pouco ou nenhum efeito. São citados como exemplos culturas de meristemas, uso de variedades resistentes e plantio de tubérculos comprovadamente livre de vírus. Outra medida importante é o isolamento em relação a outras culturas de solanáceas, desfavorecendo assim a ocorrência de doenças pela distância das fontes de inóculo, bem como o "roguing" de plantas com sintomas de viroses, impedindo que o vírus seja introduzido na cultura através de diversos agentes de disseminação, além dos programas de certificação de sementes (Weidemann, 1988; Bedendo, 1995; Matthews, 1992)

O controle de vetores é uma das mais importantes medidas de controle de doenças de etiologia viral, podendo ser realizado através do uso de inseticidas, barreiras vegetais que podem dificultar o acesso de vetores às áreas cultivadas, e ainda através da utilização de superfícies refletoras, como lâminas de alumínio, filmes plásticos ou palha vegetal, que são dispostos próximos às plantas, com a finalidade de repelir os insetos, impedindo que estes cheguem à cultura. (Mowry, 1995; Peters, 1987; Barbosa, Ávila e França, 1984; Bedendo, 1995)

No controle de viroses é necessária a interrupção do ciclo epidêmico do vírus, envolvendo plantas hospedeiras e vetores. Um vírus pode causar uma epidemia se todos os fatores, e sua interação com o ambiente, também forem favoráveis por um longo período ( Weidemann, 1988).

A capacidade produtiva da batata depende largamente da qualidade da semente, que pode ser afetada por alguns fatores, como a ausência de patógenos (vírus, fungos, bactérias, nematóides), estágio fisiológico de desenvolvimento, autenticidade e pureza da variedade, e também o tamanho e conformação dos tubérculos. Nem todos esses fatores mencionados possuem igual importância, devendo-se considerar a ausência de patógeno como a mais importante qualidade da semente. Daí a necessidade do conhecimento dos patógenos que afetam a cultura da batata no Brasil, levando a obrigatoriedade da implantação de programas de certificação de batata-semente (De Bokx e Mooi, 1974; Vechi, Hirano e Bertoncini, 1984). Daniels (1983) ressalta que a batata semente é o insumo mais dispendioso para a implantação de uma lavoura, representando mais de 50 % do custo total. Portanto, qualquer redução no custo da batata semente influi significativamente no custo final de produção.

## **2.6 Programas de Certificação**

A detecção de vírus em plantas, com base apenas nos sintomas é difícil e duvidosa, visto que plantas infectadas podem ser assintomáticas, como no caso do PVX, ou apresentar sintomas leves, ou que podem ser confundidos com outras causas fisiológicas, como no caso do PLRV (Opgenorth e Braum, 1987). A simples observação da folhagem, como em geral são feitas atualmente as inspeções de campo, não é suficiente para permitir a identificação de infecções tardias. Portanto, a indexação de vírus é uma maneira indispensável para a formação de estoques básicos livres de vírus. (Costa, 1948; Cupertino e Costa 1969; Siqueira 1968; Bedendo, 1995)

A certificação da batata-semente vem sendo praticada desde o início do século em vários países, no sentido de uma consistente seleção para a qualidade e sanidade durante o processo de propagação, o que só se tornou possível através dos progressos no estabelecimento dos critérios de seleção, em que se procurava manter o melhor estado sanitário possível através de inspeções visuais e erradicação de plantas doentes. (Sheppard e Claflin, 1975; De Bokx e Mooi, 1974; Hooker, 1981; Mallozzi, 1982).

O Brasil importa a quase totalidade das sementes básicas empregadas, pois é pequena a produção nacional dessa classe de sementes. Porém a necessidade de melhorar a qualidade sanitária da batata-semente aqui produzida, possibilitando dessa forma um aumento no número de multiplicações do material importado, levou o país a adoção de normas para a produção de batata-semente, através do estabelecimento de um programa de certificação. (Siqueira, 1968; Vechi, Hirano e Bertoncini, 1984; Mallozzi, 1982).

Desde o início das tentativas de produção de batata semente de alta qualidade fitossanitária no país, uma das maiores dificuldades dos técnicos responsáveis pela fiscalização dos campos tem sido a diagnose visual das moléstias viróticas, pois existe uma série de fatores que podem mascarar os sintomas provocados por vírus, como cultivar, temperatura, idade da planta, entre outros, existindo, assim, a necessidade de se efetuarem testes mais eficientes para a detecção dos principais vírus, antes de ser emitido qualquer certificado de sanidade do material, para resguardar a idoneidade do serviço de certificação. (Cupertino, 1984).

O desenvolvimento de técnicas capazes de detectar vírus e identificá-los, permitiu o estabelecimento de um serviço de controle da sanidade da batata-semente não apenas

baseado na sintomatologia e erradicação, mas também em controle cultural e testes de laboratório ( Mallozzi, 1976; Sequeira, 1992).

## 2.7 Principais técnicas de diagnose

Apesar de os programas de certificação de batata semente no Brasil já serem bastante antigos, só recentemente os resultados de inspeções no campo são complementados por testes em laboratório, com resultados mais rápidos e precisos.

Nas últimas décadas uma gama de testes sorológicos foi desenvolvida, baseando-se na capacidade antigênica dos vírus, e seu reconhecimento específico por anticorpos policlonais. Devido à sensibilidade e simplicidade, esses testes sorológicos passaram a ser utilizados na detecção e identificação de vírus (Testes de Aglutinação com Látex, Dupla Difusão em Gel de Ágar, Microprecipitina, MEIAD ("Microscopic Eletronic Immunosorbent Assay Decoration") principalmente em plantas de propagação vegetativa, sementes, plantas perenes e insetos vetores.(Lima 1979; Gama, Ávila e Nakashima, 1987; Sequeira, 1992; Pio Ribeiro et al., 1994; Daniels, 1994; Brioso et al. 1996). Entretanto o uso de técnicas sorológicas em diagnoses de rotina só foi realmente implementado por ocasião do desenvolvimento da técnica ELISA por Voller et al. (1976), que apresenta um enorme potencial para detecção e quantificação de vírus, tendo sido investigada e adaptada na "East Mailing Research Station" por Clark e Adams (1977 ).

A técnica ELISA pode ser aplicada para vírus de diversos tipos morfológicos, tanto em preparados purificados, quanto em extratos brutos. O método é particularmente conveniente quando existe um grande número de amostras a serem testadas em um curto espaço de tempo. Ele é bastante sensível detectando concentrações tão baixas



quanto 1 a 10 $\mu$ g/ml, e tem sido bastante explorado para a diagnose de vírus de plantas (Matthews, 1992; Tamada e Harrison, 1980; Maat e Huttinga, 1987; Barker, 1993; Gugerli e Gehriger, 1980; Whintworth, Allen e Sanson, 1993 ).

Nas últimas décadas o teste DAS-ELISA (Double antibody sandwich) tem sido o teste sorológico preferido para detectar vírus de plantas, pela sua simplicidade, adaptabilidade , rapidez e sensibilidade, podendo ser utilizado em grande escala para diagnose de um grande número de amostras ao mesmo tempo. No Brasil tem sido utilizado para a detecção de diversos tipos de vírus de plantas (Dusi, Carvalho e Zambolin, 1987; Berian, 1985; Figueira, Domier e Darcy, 1995; Martins, Lima e Kitajima, 1994; Daniels, 1994; De Bokx, Piron e Maat, 1980).

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi conduzido em casa de vegetação e no laboratório de Virologia do Departamento de Fitopatologia da UFLA, no período de setembro de 1996 a abril de 1997.

As fontes de inóculo utilizadas foram provenientes da coleção mantida no Departamento de Fitopatologia da UFLA, estabelecidas nas seguintes indicadoras: *Gomphrena globosa* (PVX), *Nicotiana tabacum*, cultivar TNN (PVY), e *Physalis floridiana* (PLRV). Também foram utilizadas plantas de batata da cultivar Achat, naturalmente infectadas no campo.

A cultivar de batata utilizada nos experimentos foi a Achat, escolhida para este trabalho pelo fato de ser a mais plantada, no Estado de Minas Gerais, e de ser a primeira a apresentar problemas de alta incidência de PVY no campo. É uma cultivar de origem alemã, ciclo precoce, apresenta plantas de altura média, com hábito de crescimento ereto

e seus tubérculos são alongados e achatados. Possui hastes com pigmentação violeta e produtividade em torno de 10 t/ha. É descrita como susceptível ao PLRV, resistente ao PVX e ao PVY (Santos, Andrigueto e Camargo, 1986).

O presente estudo foi desenvolvido em três etapas: na primeira delas foi testada a possibilidade de fazer a diagnose simultânea do PLRV, PVY e PVX numa mesma amostra; na segunda foi comparada a multiplicação do PLRV e do PVY na planta de batata inoculada no início do ciclo, e, finalmente, na terceira etapa, foi verificada a eficiência do teste serológico DAS-ELISA, para detectar vírus em hastes de plantas no final do ciclo e em tubérculos de batata-semente (tubérculos sem brotar (dormentes), após a emissão dos brotos e nas respectivas plântulas), oriundos de plantas inoculadas em diferentes épocas do ciclo.

### **3.1. Diagnose simultânea dos vírus X, Y e do PLRV**

Para diagnose simultânea desses vírus foram utilizadas as plantas indicadoras citadas anteriormente, inicialmente semeadas em bandejas plásticas, e posteriormente transplantadas para vasos com capacidade para 2 kg, mantida sob condições de casa de vegetação. As inoculações, com os respectivos vírus, foram feitas cerca de quinze dias após o transplante.

Foram utilizadas também plantas de batata, obtidas pelo plantio de tubérculos-semente plantados em vasos com capacidade para 5 Kg. Quinze dias após a emergência, foi realizado um desbaste, deixando-se apenas uma haste por planta, para inoculação experimental.

As plantas indicadoras e as de batatas foram inoculadas com as seguintes combinações de vírus: a) PVY + PVX ; b) PVY + PLRV c) PVX + PLRV; e d) PVX + PVY + PLRV, além dos vírus isoladamente.

O PLRV foi inoculado através do afídeo vetor *Myzus persicae*, criado em plantas saudas de pimentão (*Capsicum annum* L.) e de *Nicandra physaloides* estabelecidas em gaiolas apropriadas. Esses afídeos foram submetidos a um período de jejum de 30 min e em seguida colocados para se alimentarem em plantas de *P. floridiana* infectadas, por 48 horas, após o que, foram transferidos para plantas saudas, onde permaneceram por mais 48 h., antes de serem eliminados com inseticida. Foram utilizados 50 pulgões por planta.

O PVX e o PVY foram inoculados mecânicamente por fricção com carborundum, utilizando-se como inóculo folhas de plantas indicadoras maceradas em tampão fosfato 0,01 M pH 7,0, contendo Sulfito de Sódio 0,01 M . Após a inoculação as plantas foram lavadas e mantidas em casa de vegetação.

Para realização do teste sorológico DAS-ELISA foram utilizados antissoros provenientes da firma comercial Boehringer Mannheim. Os tampões para cobertura (Carbonato/bicarbonato pH 9,5 ), para a extração das amostras (tampão fosfato salino (PBS) pH 7,4 + Polivinilpirolidona (PVP) 20g/l), para a diluição do conjugado (PBS + 0,1 % de leite desnatado + 0,01 % de Tween 20), para lavagens ( PBS + Tween 20 a 0,1 %), para solução de bloqueio ( PBS + 0,5 % de leite desnatado ) e para a diluição do substrato ( Dietanolamina pH 9,8 ) foram preparados no laboratório do DFP/UFLA.

Para avaliar a possibilidade da diagnose simultânea, dos vírus X, Y e do enrolamento da folha da batata, as placas, com 96 orifícios, foram cobertas com diversas

combinações dos diferentes antissoros como segue: a) PLRV + PVY; b) PLRV + PVX; c) PVY + PVX; d) PLRV + PVY + PVX. e também placas para PVY, PVX e PLRV, isoladamente. Para as placas cobertas com dois antissoros utilizaram-se os seguintes volumes: 50 µl/orifício, contendo os antissoros diluídos na concentração final de 1:5000, e 100 µl/orifício contendo os dois antissoros com a concentração final de 1:2500. Para as placas contendo três antissoros, utilizou-se um total de 150µl/orifício com a concentração final, para cada um, de 1:5000. Depois de cobertas, foram incubadas por 2 horas em estufa a 37 °C, lavadas três vezes em água deionizada, e uma vez em tampão de lavagem. Após as lavagens, adicionaram-se 100 µl/orifício da solução de bloqueio, e essas placas foram incubadas, por duas horas a 37 °C. Então descartou-se a solução de bloqueio e fez-se a adição do extrato foliar das plantas infectadas (antígeno).

Foram testadas duas concentrações dos antígenos, sendo um grama de folha infectada/80 ml de tampão de extração, e outra na última diluição capaz de ser detectada pelo teste sorológico DAS-ELISA, ou seja, 1:640 para PVY, 1:1280 para PVX e 1:160 para PLRV, determinadas em testes anteriores.

Os antígenos foram testados em diversas combinações, ou seja, a) PLRV + PVY; b) PLRV + PVX; c) PVY + PVX; d) PLRV + PVY + PVX, e PVX, PVY e PLRV isoladamente, para todas as combinações de antissoros testadas. Foram distribuídas ao acaso nas placas, oito repetições do antígeno para cada combinação de antissoro utilizados. Como controle foram utilizados extratos das plantas indicadoras e de batata saudáveis, obedecendo à mesma metodologia utilizada para as plantas infectadas. Após a adição dos antígenos, as placas foram incubadas a 4 °C por uma noite e em seguida foram lavadas como descrito anteriormente. Em seguida fez-se a adição do anticorpo

conjugado, utilizando-se os mesmos volumes e concentrações da cobertura das respectivas placas, e incubou-se por duas horas a 37 °C., com posterior lavagens e adição do substrato p-nitofenilfosfato, e nova incubação por duas horas, à temperatura ambiente. A leitura foi realizada em leitor de placa fabricado pela Dynatech Laboratories, modelo MRX, com filtro de 405 nm.

### **3.2 - Multiplicação do PVY e do PLRV em plantas de batata**

Para verificar a multiplicação dos vírus, plantas de batata da cultivar Achat, obtidas através do plantio de tubérculos em vasos, conforme descrito anteriormente, foram desbastadas e inoculadas experimentalmente aos 15 dias após a emergência. Depois disso, foram realizados testes diagnósticos através da técnica serológica DAS-ELISA aos 15, 30 e 45 dias após a inoculação, sendo que a absorbância a 405 nm foi utilizada como parâmetro comparativo para estimar a concentração dos vírus. A técnica DAS-ELISA foi realizada conforme descrito anteriormente, utilizando-se o volume de 50 µl para cobertura, antígeno, conjugado e substrato, e 100 µl da solução de bloqueio. A diluição do antissoro e do conjugado (mesma origem) foi de 1:5000, e a do antígeno de 1:5 (p/v).

### **3.3 - Eficiência do teste sorológico DAS-ELISA para detecção de vírus em haste no final do ciclo e em diferentes partes dos respectivos tubérculos**

As plantas de batata foram obtidas e inoculadas, conforme descrição anterior. As inoculações foram realizadas aos 15 e aos 45 dias após a emergência da planta.

O primeiro teste diagnóstico, através da técnica DAS-ELISA, seguindo a mesma metodologia anterior, foi realizado em hastes no final do ciclo (aproximadamente aos 75 dias pós-emergência). Depois os tubérculos produzidos, por cada planta em particular, foram colhidos separadamente, após a morte natural das ramas, pesados, etiquetados e armazenados para testes posteriores. Em seguida foram realizados testes com tecidos de tubérculos recém-colhidos, antes da emissão dos brotos. Foi retirado, de cada um deles, um cilindro com aproximadamente 3 mm de diâmetro, com um furador de rolhas, atravessando o tubérculo desde o estolão até a gema apical. Após a retirada desses cilindros, os tubérculos foram submetidos a um tratamento com ácido giberélico, na diluição de 1:200, armazenados em caixas de polietileno, forradas com papel absorvente, deixados secar e levados para uma câmara climática a 32 °C, onde permaneceram até a emissão de brotos, que foram submetidos ao teste DAS-ELISA, seguindo a mesma metodologia anterior.

Após a análise nos brotos, os tubérculos foram plantados em vasos com capacidade para 2 Kg, e após a emergência da plântula e expansão das suas duas primeiras folhas, estas foram coletadas e submetidas ao teste diagnóstico DAS-ELISA.

Em todos os testes descritos foram feitas quatro repetições da amostra testada.

### **3.4 - Avaliação dos Resultados**

Os dados trabalhados foram resultado das médias de quatro valores de absorbância de cada amostra, divididos pelo valor médio dos controles negativos.

Para avaliar a eficiência da técnica DAS-ELISA na detecção de vírus, utilizando-se hastes no final do ciclo e seus respectivos tubérculos, os dados obtidos foram

transformados segundo raiz ( $X + 0$ ) e submetidos à análise de variância e a um teste de médias (Tukey). Os dados obtidos para avaliar a multiplicação do PVY e PLRV em plantas de batata foram submetidos também à regressão polinomial.



## **4 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **4.1 - Diagnose simultânea dos vírus X, Y e do PLRV**

Os resultados dos testes realizados para verificar a possibilidade de diagnose simultânea dos vírus estudados, numa mesma amostra, encontram-se na Tabela 1. Observou-se que foi possível a detecção de vírus em todas as combinações de antissoros utilizadas, juntos ou separadamente, bem como em todos os volumes testados. Quando foram utilizadas misturas de 2 ou 3 antígenos, para os antissoros isolados ( PVY, PVX ou PLRV ), o valor observado para a absorbância a 405 nm foi semelhante ao valor obtido quando se empregou o antígeno isoladamente.

**TABELA 1** Detecção simultânea de vírus pela técnica DAS-ELISA, em extratos de folhas de plantas indicadoras, utilizando-se diferentes volumes e diferentes combinações de antígenos e de antissoros.

ANTISSOROS	Valores médios da absorbância das amostras divididos pela média da absorbância dos controles nas diferentes combinações testadas														MÉDIA DA ABSORBÂNCIA DOS CONTROLES
	ANTÍGENOS														
	PVX		PVY		PLRV		PVX+PVY		PVX+PLRV		PVY+PLRV		PVX+PVY+PLRV		
a	b	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b		
PVX	23,5	11,4	-	-	-	-	28,61	11,71	26,83	9,62	-	-	25,20	8,72	0,096
PVY	-	-	19,14	12,78	-	-	20,42	14,59	-	-	18,62	13,88	20,94	14,72	0,138
PLRV	-	-	-	-	3,72	1,76	-	-	3,39	2,55	3,52	2,62	4,79	2,64	0,130
PVX+PVY(50**)	23,69	12,41	22,32	13,66	-	-	33,04	21,46	-	-	-	-	31,24	12,79	0,083
PVX+ PVY(100)	22,34	14,99	21,39	22,92	-	-	21,99	22,87	-	-	-	-	21,91	22,82	0,140
PVX+PLRV(50)	23,66	11,21	-	-	6,67	5,14	-	-	29,16	13,82	-	-	27,20	12,09	0,085
PVX+PLRV(100)	21,74	12,34	-	-	8,31	5,90	-	-	21,91	15,05	-	-	22,23	21,66	0,137
PVY+PLRV(50)	-	-	15,24	9,14	3,90	2,17	-	-	-	-	15,19	10,60	16,77	5,04	0,166
PVY+PLRV(100)	-	-	23,14	19,07	22,24	18,98	-	-	-	-	23,62	18,05	23,58	15,87	0,128
PVX+PVY+PLRV(50)	22,50	11,22	28,50	21,09	25,37	19,96	33,55	27,16	30,39	23,36	31,18	25,87	30,18	3,50	0,098
PVX+PVY+PLRV(100)	20,56	18,10	23,84	23,19	23,92	23,35	27,61	27,14	26,20	25,79	26,64	25,98	24,85	24,8	0,120
PVX+PVY+PLRV(150)	11,63	7,00	13,37	4,08	8,54	6,58	17,12	9,35	13,69	8,82	15,49	7,92	15,44	13,06	0,193

\*\* µl/orifício da placa.

a: diluição do antígeno - 1:80

b: Maior diluição do antígeno que mostrou ELISA positivo em testes prévios

De um modo geral, a maior concentração dos antígenos manteve sempre uma maior absorvância, independentemente das combinações empregadas.

Quanto aos diferentes volumes de antissoro testados, o de 100  $\mu$ l/orifício foi o que apresentou maiores valores de absorvância para todas as combinações de antissoro-antígeno, entretanto, com o volume de 50  $\mu$ l/orifício foi possível a detecção segura de todas as combinações testadas. Os valores de absorvância apresentados por este último volume foram apenas 34 % menores que os valores para o volume de 100  $\mu$ l/orifício, não inviabilizando, portanto, o uso do menor volume, porque estes foram sempre maiores que 2 vezes o valor médio da absorvância dos controles, o que significa uma economia substancial de reagentes, obtendo-se resultados igualmente seguros.

A técnica DAS-ELISA descrita na literatura utiliza o volume de 200  $\mu$ l/orifício (Voller et al. 1976; Clark e Adams, 1977) para cada reagente; no entanto, segundo Figueira, Domier e Darcy (1995) a utilização do volume de 50  $\mu$ l/orifício apresentou a mesma confiabilidade, para a diagnose de outros vírus, o que também pode ser comprovado neste trabalho para os três vírus estudados.

Para a detecção simultânea dos vírus, usando como antígeno tecidos de plantas de batata infectadas (Tab 2), os resultados foram semelhantes aos obtidos quando se utilizou como antígeno suco de plantas indicadoras, o que nos permite dizer que é possível, através do teste sorológico DAS-ELISA, a detecção simultânea dos principais vírus que afetam a batata, utilizando-se para isto uma única placa.

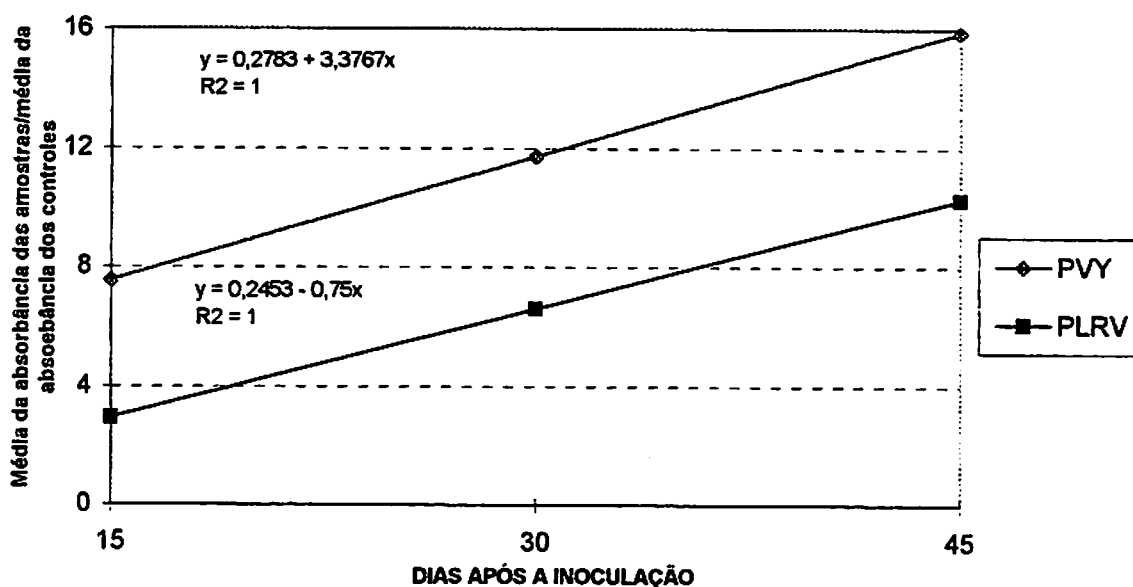
**TABELA 2** Detecção simultânea de vírus, pela técnica DAS-ELISA, em extratos de plantas de batata cv. Achat infectadas com um ou mais vírus, utilizando-se diferentes combinações de antígenos e de antissoros.

ANTISSOROS	Valores médios da absorbância das amostras divididos pela média da absorbância dos controle nas diferentes combinações testadas				Média da Absorbância dos controles
	ANTÍGENOS				
	PVX+PVY	PVY+PLRV	PVX+PLRV	PVX+PVY+PLRV	
PVX	6,58 <sup>*</sup>	-	5,02	2,21	0,22
PVY	17,07	9,64	-	11,14	0,18
PLRV	-	6,44	2,66	3,90	0,17
PVX+PVY	12,39	5,32	2,33	4,01	0,22
PVY+PLRV	2,30	11,07	2,61	7,53	0,17
PVX+PLRV	4,99	2,60	5,00	7,71	0,16
PVX+PVY+PLRV	3,91	5,33	7,72	11,06	0,14

Nas amostras que mostrarem reação positiva, a identidade viral poderá ser determinada pela utilização individual dos antissoros, o que representa uma economia significativa do material necessário nos testes, bem como de mão de obra especializada. Os testes diagnósticos utilizando mistura de antissoros poderão ser utilizados na indexação de material proveniente de culturas *in vitro* e limpeza clonal ou quando for importante a obtenção de um material totalmente livre de vírus, desejando-se detectar apenas a presença ou ausência de vírus e não a identidade de cada um deles. Esse tipo de trabalho não tem sido muito explorado na literatura.

## 4.2 - Multiplicação do PLRV e PVY em plantas de batata inoculadas no início do ciclo

A Fig. 1 representa a multiplicação do PLRV e PVY em plantas de batata, ao longo do ciclo vegetativo. Pode-se observar que o comportamento dos dois vírus é semelhante, ou seja, a concentração de partículas virais aumenta progressivamente nos tecidos da planta com o passar do tempo. No entanto, a concentração do PVY é bem maior quando comparada à do PLRV, e pela equação das retas pode-se observar que a taxa de multiplicação do PVY, nessa cultivar, é bem maior do que a do PLRV.



**FIGURA 1** - Concentração do PVY e do PLRV ao longo do ciclo de plantas de batata inoculadas aos 15 dias pós-emergência.

Aos 15 dias após a inoculação o PVY já havia atingido valores de absorbância muito próximos aos que o PLRV apresentou aos 30 dias após a inoculação. Aos 45 dias pode ser observado que as plantas infectadas com PVY apresentaram praticamente o

dobro de partículas virais, em relação às encontradas nas plantas inoculadas com PLRV. Estes dados contrariam a descrição da cultivar Achat apresentada por Santos, Andrigueto e Camargo. (1986) que faz referência a ela como sendo resistente ao PVY e suscetível ao PLRV.

A estirpe empregada nesse trabalho foi a recentemente introduzida no país, provavelmente através da cultivar Achat, e que tem mudado completamente o quadro da bataticultura nacional (Figueira e Pinto, 1995). Desde o início do programa de certificação de sementes de batata no país, o PLRV tem sido o vírus predominante no campo, sendo a principal causa da degenerescência do material importado (Cupertino e Costa, 1970a; Mallozzi, 1982; Souza Dias, Costa e Ramos, 1984; Souza Dias, Amâncio e Costa, 1990; Andrade e Figueira, 1991). Os dados obtidos explicam por que pode ter ocorrido essa mudança, pois a maior multiplicação do PVY, aliado à sua transmissão do tipo estiletar, pode estar tornando a sua disseminação mais fácil e rápida que a do PLRV. De fato a sua incidência tem superado a do PLRV nos lotes de sementes produzidos em Minas Gerais, e em outros estados do país (Figueira, Pinto e Moraes, 1996). Segundo Weidemann (1988), no geral, a maioria das cultivares de batata são mais tolerantes ao PVY<sup>N</sup> do que ao PVY<sup>O</sup>, e a resistência de plantas maduras é desenvolvida mais tardiamente para PVY<sup>N</sup> que para PVY<sup>O</sup>. Isso já foi observado no Brasil por Andrade e Figueira (1992), que encontraram incidências acima de 80 % de PVY<sup>O</sup> em levantamentos realizados nos anos de 1984 a 1989 no Estado de Minas Gerais. Entretanto, após a entrada dessa nova estirpe necrótica, esse quadro tem se revertido muito rápido.

Chrzanowska (1991) descreveu um novo isolado do PVY<sup>N</sup> encontrado na cv. Wilga, em campos situados na Polônia, induzindo sintomas semelhantes aos

apresentados pela cv. Achat, infectada com essa nova estirpe aqui no Brasil (mosaico leve). Segundo esse autor, esse isolado foi encontrado em altas concentrações, sendo mais infectivo que os isolados de PVY<sup>N</sup> conhecidos até então, mesmo nas cultivares consideradas tolerantes. Ele destaca também o aumento acelerado desse vírus nos campos produtores de batatas, de vários países da Europa, nestes últimos anos. Isso reforça a possibilidade de que este vírus tenha vindo para o Brasil via tubérculos sementes importados da Europa.

#### **4.3 - Eficiência do teste sorológico DAS-ELISA, para detectar vírus em hastes de plantas no final do ciclo e em seus respectivos tubérculos e plântulas**

Neste experimento, em que foram inoculadas 31 plantas com PVX aos 15 dias e 75 plantas aos 45 dias pós-emergência, observou-se que, das plantas inoculadas no início do ciclo, foi possível detectar o vírus em 15 destas (48,4 %). Entretanto, não foi possível a detecção desse vírus em nenhum dos tubérculo, brotos ou plântulas oriundas dessas plantas positivas. Quanto às inoculadas no final do ciclo, nenhuma delas apresentou resultado positivo nas diferentes partes da planta testadas. Isso mostra que a cultivar Achat, que é descrita como resistente ao PVX, expressou um bom nível de resistência a esse vírus.

Os resultados da diagnose do PLRV e do PVY, em diferentes partes da planta inoculadas no início e no final do ciclo, estão representados nas tabelas 3 e 4 e nas figuras 2 e 3. As médias que foram utilizadas para confecção das figuras 2 e 3 estão relacionadas nas tabelas de número 5 até 8 e os testes de médias encontram-se nas tabelas de número 1 A E 2 A (anexo). A diagnose do PVY, em hastes no final do ciclo,

em plantas inoculadas aos 15 dias após a emergência, mostrou um valor médio de absorvância de 15 e a do PLRV de 7,8 vezes a média da absorvância dos controles negativos. Nas inoculadas aos 45 dias, esse valor foi de 5 vezes a media do controle para o PVY e de 6,5 vezes para o PLRV (Figs. 2 e 3). Pode-se observar que, a planta de batata da cultivar Achat, quando infectada no final do ciclo, permitiu uma maior multiplicação do PLRV que do PVY. Entretanto, parece ter havido uma maior resistência dessa planta à infecção pelo PLRV na inoculação feita no final do ciclo, pois, das plantas inoculadas, apenas 9,6% se tornaram infectadas com esse vírus, contra as 35% infectadas com PVY. Algumas das plantas inoculadas aos 45 dias, com PVY, apresentaram ELISA negativo nas hastes, porém o vírus pode ser detectado em seus tubérculos. Isso aconteceu com 16,3% das plantas inoculadas, o que não foi verificado com o PLRV, nas condições experimentais estabelecidas.



TABELA 3 Resultado da diagnose do PVY e do PLRV pela técnica DAS-ELISA em hastes, no final do ciclo, de plantas de batata cv. Achat inoculadas aos 15 dias pós-emergência, e respectivos tubérculos e plântula

Partes da Planta Testadas	Porcentagem de infecção(% IN) e escape (% ESC) nos diferentes materiais testados, em relação					
	PVY			a tubérculos, brotos e plântulas (a,b,c) PLRV		
	Nº. Test./ Nº. Infec.	% IN	% de *ESC	Nº. Test./ Nº. Infec.	% IN	% *ESC
Hastes no final do ciclo	50/33	66	0 <sup>a</sup>	50/18	36	0
Tubérculos	105/0	0	100 <sup>b</sup>	134/11	8,2	72,5
Brotos dos tubérculos	105/61	58,1	9,0 <sup>c</sup>	134/31	23,1	22,5
Plântulas	105/67	63,8	0	134/40	29,9	0

\*a - Plantas cujas hastes apresentaram ELISA negativo, mas que apresentaram tubérculos e plântulas positivas

b - Tubérculos que apresentaram ELISA negativo, mas apresentaram brotos e plântulas positivas.

c - Tubérculos que apresentaram ELISA negativo para os brotos, mas que apresentaram plântulas positivas.

**TABELA 4** Resultado da diagnose do PVY e do PLRV pela técnica DAS-ELISA, em hastes no final do ciclo, de plantas de batata cv. Achat inoculadas aos 45 dias pós-emergência, e respectivos tubérculos e plântulas.

relação	Porcentagem de infecção (% IN) e escape (% ESC) nos diferentes materiais testados com						
	Partes da Planta Testadas	PVY			à tubérculos, brotos e plântulas (a,b,c) PLRV		
		Nº. Test./ Nº. Infec.	% IN	% de *ESC	Nº. Test./ Nº. Infec.	% IN	% *ESC
Hastes no final do ciclo	80/28	35	16,3	52/5	9,6	0	
Tubérculos	262/0	0	100	117/0	0	100	
Brotos dos tubérculos	262/38	14,5	7,3	117/1	0,9	87,5	
Plântulas	262/41	15,7	0	117/8	6,8	0	

\*a - Plantas cujas hastes apresentaram ELISA negativo, mas que apresentaram tubérculos e plântulas positivas

b - Tubérculos que apresentaram ELISA negativo, mas apresentaram brotos e plântulas positivas.

c - Tubérculos que apresentaram ELISA negativo para os brotos, mas que apresentaram plântulas positivas.

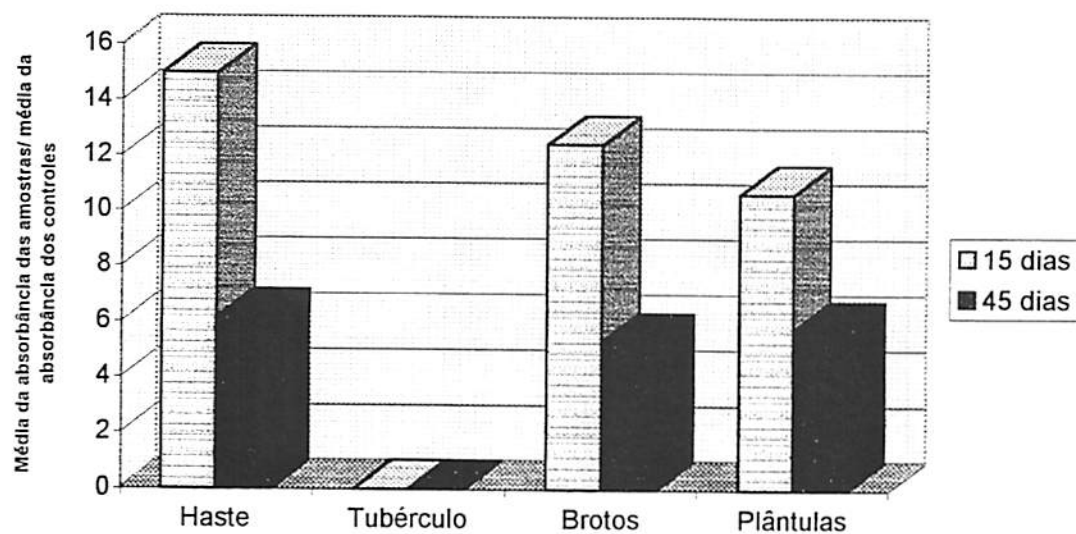


FIGURA 2 Detecção de vírus em hastes, no final do ciclo, de plantas infectadas com PVY, que foram inoculadas aos 15 e 45 dias pós-emergência, e seus respectivos tubérculos e plântulas.

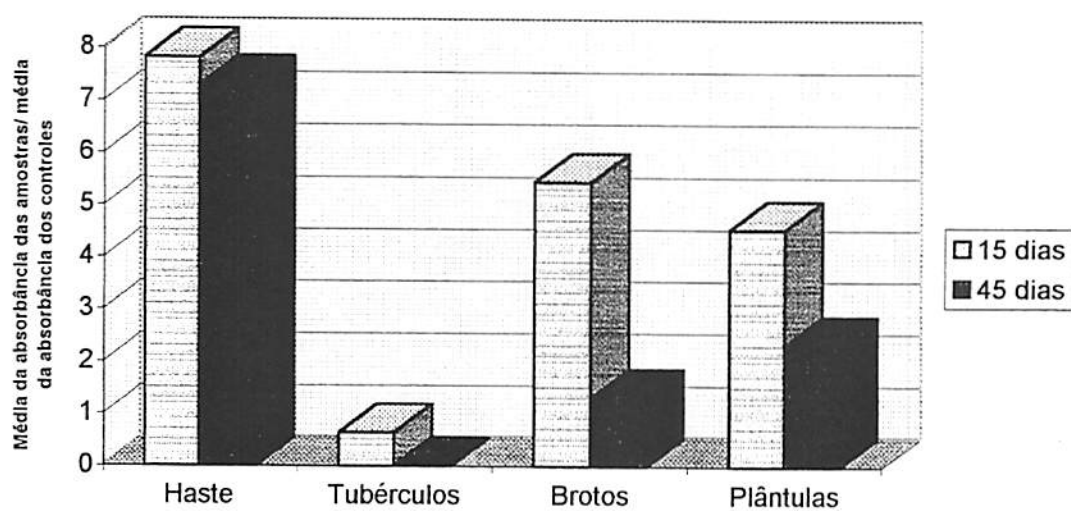


FIGURA 3 Detecção de vírus em hastes, no final do ciclo de plantas infectadas com PLRV, que foram inoculadas aos 15 e 45 dias pós-emergência, e seus respectivos tubérculos e plântulas.

Todos os resultados da diagnose do PVY, em tecidos de tubérculos sem brotar, nas plantas inoculadas aos 15 e 45 dias do ciclo, foram negativos. No caso do PLRV foi possível detectar o vírus em 27,5% dos tubérculos infectados, oriundos de plantas inoculadas aos 15 dias, mas em nenhum tubérculo das inoculadas aos 45 dias (tabela 4). Entretanto, ao se examinar a figura 3, pode-se notar que se for considerada a média geral das absorbâncias encontradas, na detecção do PLRV em todos os tubérculos sem brotar, essa caiu para 1,5 vezes a média dos controles negativos (para serem considerados positivos deveriam ser 2 vezes maior que a média dos controles negativos). Este resultado diferiu estatisticamente dos demais ao nível de 1% de significância, pelo teste de Tukey.

Tamada e Harrison (1980), em trabalhos realizados para detecção de PLRV em tubérculos de batata, observaram que, em algumas situações, plantas com infecção primária deste vírus comportaram-se como plantas livres de vírus, devido ao fato de a translocação dos produtos fotossintetizados ser prejudicada pela infecção com o PLRV, não chegando, assim, a grandes concentrações nos tubérculos. Entretanto, quando a infecção ocorre no início do ciclo, é possível uma certa estimativa da infecção nos tubérculos, mas quando a infecção ocorre tardiamente, não é possível uma detecção segura do vírus. Beemster (1987) relata que a concentração de vírus em tubérculos com infecção primária é muito baixa, especialmente quando estes tubérculos são obtidos de plantas recentemente infectadas. Aparentemente o vírus pode estar em pequenas proporções no tubérculo; no entanto, após a quebra da dormência, este vírus pode eventualmente atingir, em pouco tempo, uma alta concentração, aumentando mais ainda

quando os tubérculos são plantados. Isso explica as porcentagens de escapes na diagnose nos brotos dos tubérculos.

Os resultados obtidos no presente trabalho mostraram que é possível a diagnose, tanto do PVY quanto do PLRV, na haste no final do ciclo, nos brotos e nas plântulas com a mesma confiabilidade estatística, mostrando ainda que os melhores resultados foram conseguidos nas hastes no final do ciclo, para os dois vírus inoculados aos 15 dias após emergência da plântula. Somente para o PVY houve o escape de 16,5% na sua detecção nessas hastes, quando a inoculação foi feita aos 45 dias pós-emergência. Esses resultados são bastante importantes para direcionar os testes de indexação de batata-semente realizados no país. Apesar de já estarem em funcionamento, fazendo uso do teste DAS-ELISA há cerca de 10 anos, não existem dados comprobatórios sobre a sua eficiência, para detectar infecções precoces e tardias, quando aplicado nas diferentes partes da planta. Existem notícias de produtores que tiveram grande prejuízo com a comercialização de sementes supostamente sadias, pelo teste DAS-ELISA realizado no tubérculo sem brotação, e que depois mostraram incidência de mais de 50% PVY no campo (Figueira, 1997\*).

---

\* Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Figueira, Antonia dos Reis, professora pesquisadora do Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Lavras, Lavras-MG. Comunicação Pessoal.

Considerando-se que a análise total dos dados mostrou que é totalmente inviável a detecção de vírus nos tubérculos sem brotar, fez-se um agrupamento dos dados referentes às plantas infectadas, provenientes dos experimentos com inoculações aos 15 e 45 dias pós-emergência, com o objetivo de avaliar a porcentagem de tubérculos infectados em cada planta e comparar a porcentagem de escape nos brotos, em relação às plântulas oriundas dos mesmos tubérculos. Esses dados estão representados nas tabelas 5, 6, 7 e 8. As plantas inoculadas com PVY, aos 15 dias pós-germinação, apresentaram 100 % dos tubérculos contaminados, enquanto que nas inoculadas no final do ciclo a contaminação foi de apenas 54%. Quando inoculadas com PLRV, aos 15 dias pós-germinação, as plantas apresentaram 77,5 % dos tubérculos contaminados e as inoculadas aos 45 dias apresentaram uma translocação de vírus para os tubérculos de 47%. Esse fato foi observado anteriormente por Gibson (1991) que, trabalhando com resistência de plantas maduras, notou que plantas de batata inoculadas no final do ciclo produziram uma mistura de tubérculos infectados e não infectados.

Aliado a essa menor translocação de partículas virais para o tubérculo, em infecções tardias, deve-se considerar a existência também de uma resistência à infecção por parte das plantas maduras. Conforme pode ser observado, nas tabelas 3 e 4, a taxa de infecção das plantas inoculadas experimentalmente, caiu de 66 para 33 % da primeira para a segunda época para o PVY e de 36 para 9,6% para o PLRV.

**TABELA 5** Resultado da diagnose do PVY, pela técnica DAS-ELISA, nos tubérculos e respectivas plântulas provenientes de cada uma das plantas de batata cv. Achat infectadas, inoculadas aos 15 dias do ciclo vegetativo.

Identificação das plantas	Nº. de tubérculos testados	Número de brotos positivos	% de infecção	Nº. de plântulas positivas	% de infecção	% de escape*
1 - Y	3	3	100	3	100	0
2 - Y	3	1	33,33	3	100	66,66
3 - Y	2	2	100	2	100	0
4 - Y	2	2	100	2	100	0
5 - Y	1	1	100	1	100	0
6 - Y	3	2	66,66	3	100	33,33
7 - Y	2	2	100	2	100	0
8 - Y	2	2	100	2	100	0
9 - Y	2	1	50	2	100	50
10 - Y	1	1	100	1	100	0
11 - Y	3	3	100	3	100	0
12 - Y	4	4	100	4	100	0
13 - Y	2	2	100	2	100	0
14 - Y	2	2	100	2	100	0
15 - Y	3	3	100	3	100	0
16 - Y	1	1	100	1	100	0
17 - Y	1	1	100	1	100	0
18 - Y	1	1	100	1	100	0
19 - Y	2	2	100	2	100	0
20 - Y	2	2	100	2	100	0
21 - Y	1	1	100	1	100	0
22 - Y	2	2	100	2	100	0
23 - Y	2	2	100	2	100	0
24 - Y	1	1	100	1	100	0
25 - Y	3	3	100	3	100	0
26 - Y	2	1	50	2	100	50
27 - Y	2	1	50	2	100	50
28 - Y	2	2	100	2	100	0
29 - Y	1	1	100	1	100	0
30 - Y	1	1	100	1	100	0
31 - Y	3	2	66,66	3	100	33,33
32 - Y	3	3	100	3	100	0
33 - Y	2	2	100	2	100	0
<b>Totais</b>	<b>67</b>	<b>61</b>	<b>91,0</b>	<b>67</b>	<b>100</b>	<b>9,0</b>

\*Tubérculos que apresentaram ELISA negativo para os brotos, mas que apresentaram plântulas positivas

**TABELA 6** Resultado da diagnose do PVY, pela técnica DAS-ELISA, nos tubérculos e respectivas plântulas provenientes de cada uma das plantas de batata cv. Achat infectadas, inoculadas aos 45 dias do ciclo vegetativo.

Identificação das plantas	Nº tubérculos testados	Número de brotos positivos	% de infecção	Nº. de plântulas positivas	% de infecção	% de escape*
1 - Y	3	3	100	2	100	0
2 - Y	4	1	25	1	25	0
3 - Y	2	2	100	2	100	0
4 - Y	2	1	50	1	50	0
5 - Y	3	1	33,33	1	33,33	0
6 - Y	2	1	50	2	100	50
7 - Y	3	1	33,33	1	33,33	0
8 - Y	3	1	33,33	1	33,33	0
9 - Y	2	1	50	2	100	50
10 - Y	3	1	33,33	2	66,66	50
11 - Y	3	1	33,33	1	33,33	0
12 - Y	4	2	50	2	50	0
13 - Y	2	1	50	1	50	0
14 - Y	3	2	66,66	2	66,66	0
15 - Y	2	2	100	2	100	0
16 - Y	2	1	50	1	50	0
17 - Y	3	1	33,33	2	66,66	50
18 - Y	2	1	50	1	50	0
19 - Y	3	1	33,33	1	33,33	0
20 - Y	4	2	50	2	50	0
21 - Y	2	2	100	2	100	0
22 - Y	3	1	33,33	1	33,33	0
23 - Y	4	1	25	1	25	0
24 - Y	3	2	66,66	2	66,66	0
25 - Y	2	1	50	1	50	0
26 - Y	2	2	100	2	100	0
27 - Y	3	1	33,33	1	33,33	0
28 - Y	2	1	50	1	50	0
<b>TOTAIS</b>	<b>76</b>	<b>38</b>	<b>50</b>	<b>41</b>	<b>54</b>	<b>7,3</b>

\*Tubérculos que apresentaram ELISA negativo para os brotos, mas que apresentaram plântulas positivas



**TABELA 7** Resultado da diagnose do PLRV, pela técnica DAS-ELISA, nos tubérculos e respectivas plântulas provenientes de cada uma das plantas de batata cv. Achat infectadas, inoculadas aos 15 dias do ciclo vegetativo.

Identificação das plantas	Nº. tubérculos testados	Número de brotos positivos	% de infecção	Nº. de plântulas positivas	% de infecção	% de escape*
1 - E	3	1	33,33	3	100	66,66
2 - E	2	2	100	2	100	0
3 - E	3	2	66,66	3	100	33,33
4 - E	2	2	100	2	100	0
5 - E	1	1	100	1	100	0
6 - E	2	2	100	2	100	0
7 - E	3	2	66,66	3	100	33,33
8 - E	3	2	66,66	3	100	33,33
9 - E	1	1	100	1	100	0
10 - E	3	3	100	3	100	0
11 - E	2	2	100	2	100	0
12 - E	2	2	100	2	100	0
13 - E	3	2	66,66	3	100	33,33
14 - E	2	2	100	2	100	0
15 - E	2	2	100	2	100	0
16 - E	2	1	50	2	100	50
17 - E	2	1	50	2	100	50
18 - E	2	1	50	2	100	50
<b>TOTAIS</b>	<b>40</b>	<b>31</b>	<b>77,5</b>	<b>40</b>	<b>100</b>	<b>22,5</b>

\* Tubérculos que apresentaram ELISA negativo para os brotos, mas que apresentaram plântulas positivas

**TABELA 8** Resultado da diagnose do PLRV, pela técnica DAS-ELISA, nos tubérculos e respectivas plântulas provenientes de cada uma das plantas de batata cv. Achat infectadas, inoculadas aos 45 dias do ciclo vegetativo.

Identificação das plantas	Nº. tubérculos testados	Número de brotos positivos	% de infecção	Nº de plântulas positivas	% de infecção	% de escape*
1 - E	3	0	0	1	33,33	100
2 - E	2	0	0	1	50	100
3 - E	4	1	25	4	100	0
4 - E	4	0	0	1	25	100
5 - E	4	0	0	1	25	100
<b>TOTAIS</b>	<b>17</b>	<b>1</b>	<b>5,8</b>	<b>8</b>	<b>47,0</b>	<b>87,5</b>

\* Tubérculos que apresentaram ELISA negativo para os brotos, mas que apresentaram plântulas positivas.

Esses dados permitem sugerir que o melhor material a ser empregado para diagnose do PVY é o broto de tubérculos submetidos a forçamento de brotação. Isso porque o escape apresentado na detecção dos vírus em plantas infectadas, tanto no início quanto no final do ciclo, não chegou a 10%, sendo tecnicamente tolerável, o que não aconteceu em testes realizados com a haste no final do ciclo, em infecções tardias, que poderiam permitir maior escape. O fato de existir um curto período de tempo entre a colheita e comercialização dos tubérculos, inviabiliza a aplicação do teste na plântula.

Quanto ao PLRV, pode-se considerar, em uma primeira análise, que o melhor material para indexação desse vírus seria a haste no final do ciclo, devido à baixa concentração de vírus nos tubérculos e brotos, em plantas infectadas tardiamente. Porém, considerando-se a resistência de plantas maduras à infecção com o PLRV, através do

vetor, em que a maioria das plantas visitadas pode não se tornar infectada, isso compensaria a alta possibilidade de escape nos brotos dessas plantas.

Portanto, apesar da detecção de vírus nos brotos ser mais satisfatória para o PVY, permitindo um escape insignificante, também pode ser usado para o PLRV. Considerando-se que esse teste é aplicado para sementes básicas e registradas, das quais não se espera uma alta incidência de viroses, os limites de tolerância de incidência de PLRV, permitidos pelo programa de certificação de batata semente, são de 4 a 8 %, um escape de 22,5 %, elevaria esses valores para 4,9 e 9,8%, respectivamente. Caso esses valores passem a ser muito importantes epidemiologicamente, pode-se pensar em diminuir o nível de tolerância adotado para a produção de sementes, para compensar esse escape.

Apesar desses dados terem sido bastante relevantes, existe a necessidade de se testar um maior número de tubérculos, incluindo outras cultivares, para que se possa ter uma maior abrangência, para embasar com segurança o uso da técnica serológica DAS-ELISA para a indexação de vírus nas diversas cultivares plantadas no Brasil.

## 5 CONCLUSÕES

1- A detecção simultânea do PVX, PVY e PLRV, através da técnica serológica DAS-ELISA, utilizando-se uma mistura de antissoros, em plantas infectadas com um ou mais vírus, mostrou-se bastante eficiente, sendo que, o de 50 µl/orifício mostrou a mesma eficiência dos volumes maiores para a detecção desses vírus.

2 - O isolado de PVY estudado se multiplicou mais rapidamente que o PLRV, em plantas de batata da cultivar Achat, inoculadas no início do ciclo, tendo sido observados valores consistentemente mais altos de absorbância para o PVY, em todas as análises realizadas nas diferentes fases do ciclo da planta.

3 - Não se detectou o PVY em tubérculos não brotados, provenientes de plantas inoculadas aos 15 ou 45 dias após a emergência. Entretanto, foi possível a detecção do PVY na maioria dos brotos de tubérculos provenientes das plantas infectadas, inoculadas tanto aos 15 quanto aos 45 dias após a emergência, tendo em ambos os casos havido um escape menor que 10%.

4 - O PLRV foi detectado em poucos tubérculos não brotados, provenientes de plantas inoculadas aos 15 e em nenhum dos tubérculos produzidos por plantas inoculadas aos 45 dias após a emergência. A detecção do PLRV nos brotos dos tubérculos provenientes das plantas de batata, inoculadas no início do ciclo, possibilitou um escape em torno de 20%, enquanto que em brotos de tubérculos oriundos das plantas inoculadas no final do ciclo foi bastante ineficiente, permitindo um escape maior que 80%.

5 - O melhor material para ser utilizado na indexação tanto do PLRV quanto do PVY, através da técnica serológica DAS-ELISA, é o broto dos tubérculos submetidos a forçamento de brotação.

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDRADE, E. R.; FIGUEIRA, A. R. Degenerescência em seis cultivares de batata (*solanum tuberosum*. L) na região Sul de Minas Gerais. **Ciência e Prática**, Lavras, v. 15 n. 1, p. 9-15, jan./mar.1991.
- ANDRADE, E. R. FIGUEIRA, A. R. Incidência e sintomatologia de estirpes do vírus Y (PVY) nas regiões produtoras de batata do Sul de Minas Gerais. **Ciência e Prática**, Lavras, v. 16, n. 3, p. 371-376, jul./set. 1992.
- BARBOSA, S.; ÁVILA. A. C. ; FRANÇA, F. H. Vetores das principais viroses no Brasil e seu controle. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 2, n. 2, p.55-67, nov. 1984.
- BARKER, H. Incidence of potato virus Y infection in seed and ware tubers of the potato cv. Record. **Annals Applied Biology**, Invergowrie, v. 8, n. 44, p. 140-143, Sept. 1993.
- BEDENDO, I. P. Viroses. In :BERGAMIM FILHO, A; KIMATI H. E AMORIM, L. **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**. Piracicaba: Ceres, 1995, Cap. 51, v.1, p. 899-906.

- BEEMSTER, A. B. R. Virus translocation and mature-plant resistance in potato plants. In: DE BOKS, J. A.; VAN DER WANT, J. P. H.. **Viruses of potatoes and seed-potato production**. Wageningen: Pudoc, 1987. Cap 7, p. 116-125.
- BERIAN, L. O. S. A serologia como método auxiliar no controle de fitovirus. **Summa Phytopathologica**, Piracicaba, v. 1, n. 2, p. 121-126, jul. 1985.
- BOS, L. **Introduction to plant virology**. Wageningen: Pudoc, 1983. 160 p.
- BRADSHAW, J. E.; MACKAY, G. R. Inheritance of Resistance to viruses. In: \_\_\_\_\_. **Potato genetics**. Rozalin: CAB International, 1994. Cap. 15, p. 339-357.
- BRIOSO, P. S. T.; SOUZA DIAS, J. A. C.; COSTA, A. S.; OLIVEIRA, D. E. Detecção de vírus da batata em plantas infectadas e em afídeos virulíferos através dos testes de "Polymerase Chain Reaction" e de "Dot-Blot". **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 21, n. 3, p.328-335, set. 1996.
- CHRZANOWSK, 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; ADAMS, A. N. Characteristics of the Microplate Method of Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for detection of plant viruses. **Journal of General Virology**, London, v. 34, n.3, p. 475-483, 1977.
- COSTA. A. S. **Doenças de vírus do fumo, batata e tomateiro**. Rio de Janeiro: Ministério da Agricultura, 1948. 82p. (Boletim).
- COSTA. A. S. Moléstias de vírus de batata. In: \_\_\_\_\_. **Boletim do campo: tudo sobre batata**. Rio de Janeiro: [s. n.], 1965. v.190, 85p.
- CUPERTINO, F. P. Controle das doenças de vírus na cultura da batata mediante certificação. In: ENCONTRO NACIONAL DE FITOSSANITARISTAS, 3, Florianópolis, 1984. **Anais...** Brasília: MA - Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária, 1984. p. 131-139.

- CUPERTINO, F. P.; COSTA A. S. Determinação do vírus do enrolamento em hastes velhas de batatal para semente. **Bragantia**, Campinas, v. 26, n.13, p. 181-189. maio 1969.
- CUPERTINO, F. P.; COSTA, A. S. Determinação da disseminação do vírus do enrolamento em batatal para semente pelo uso de plantas indicadoras. **Bragantia**, Campinas, v. 29, n.12, p.122-137, abr. 1970 a .
- CUPERTINO, F. P.; COSTA A. S. Avaliação das perdas causadas por vírus na produção de batata. **Bragantia**, Campinas, v. 29, n.31, p. 337-345, out. 1970 b.
- DANIELS, J. Efeito do forçamento da brotação, colheita antecipada e níveis populacionais de afídeos na produção e degenerescência da batata. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 8, n. 1, p.123-130, fev. 1983.
- DANIELS, J. Métodos imunológicos utilizados na diagnose de doenças de plantas. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v. 2, p. 53-84, 1994.
- DANIELS, J.; PAIVA, E.; ASSIS, M. DE; CASTRO, L. A. S. Produção e utilização de antissoros para diagnose de viroses em batata. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 9, p.344, ago. 1994. (Suplemento-Resumo, 412).
- DE BOKX, J. A. Biological properties. In: DE BOKS, J. A.; VAN DER WANT, J. P. H. **Viruses of Potatoes and seed-potato production**. Wageningen: Pudoc, 1987. Cap 5, p. 58-82.
- DE BOKX, J. A.; MOII, J. C. Methods of quality assessment of seed potatoes. **Potato Research**, Wageningen, v.17, n. 3, p. 410-433, 1974.
- DE BOKX, J. A.; PIRON, P. G. M; MAAT D. Z. Detection of potato vírus X in tubers with the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). **Potato Research**, Wageningen, v.23, n. 1, p.129-131, 1980.
- DE BOKX, J. A.; VAN DER WANT, J. P. H. **Viruses of potatoes and seed-potato production**. Wageningen: Pudoc, 1987. 259 p.



- DIFONZO, C. D.; RAGSDALE, D. W.; RADCLIFF, E. B. Suceptibility to Potato Leafroll Virus in Potato: Effectes of cultivar, Plant Age at Inoculation, and Inoculation Pressure on Tuber Infection. **Plant Disease**, Minnesota, v. 78 n. 12, p. 1173-1177, Dec. 1994.
- DUSI, A. N.; CARVALHO, M. G. DE; ZAMBOLIM, L. O teste de difusão radial simples comparado ao ELISA na detecção de VMCF em sementes de feijoeiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.12, p.149, jul. 1987. (Suplemento-Resumo, 179).
- FACCIOLI, G. Fitopatie virale e simili della patata. **Informatore Fitopatologico**, Bologna, v. 4, n.84, p. 47-55, 1984.
- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **Monthly bulletin of statistics**. Rome, 1994. v. 7.
- FIGUEIRA, A.R.; DOMIER, L.L.; DARCY, C. D. Detection of Barley Yellow Dwarf Virus-PVA- IL by using differnts techniques. **Phytopathology**, Parma, v. 85, n. 10, Oct. 1995. (Resumo, 730).
- 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, ago. 1995. (Suplemento-Resumo, 128).
- FIGUEIRA, A. R.; PINTO, A, C. S.; MORAES, F. H. R. Alta incidência da nova estirpe necrótica do vírus Y da batata, está ocorrendo em todos os estados produtores do Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 21, p.427, ago. 1996.(Suplemento-Resumo 537).
- FIGUEIRA, A. R.; RESENDE, R. O.; BOARI, A. J. Seed potato virus indexation in Minas Gerais state. In: ENCONTRO NACIONAL DE VIROLOGIA, 4, São Lourenço-MG, 1988, **Resumos...** São Lourenço: Sociedade Brasileira de Virologia, 1988. p. 135.
- GAMA, M. I. C. S.; AVILA, A.C.; NAKASHIMA, I. Produção de látex sensibilizado para detecção do vírus X da batata. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 12, n. 3, p. 274-275, set. 1987.

- GIBSON, R. W. The Development of mature plant resistance in four potato cultivares against aphid-inoculated potato virus Y<sup>0</sup> and Y<sup>N</sup> in four potato cultivars. **Potato Research**, Wageningen, v.34, n. 1, p. 205-210, 1991.
- GUGERLI, P.; GEHRIGER, W. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of potato leafroll virus and potato virus Y in potato tubers after artificial break of dormancy. **Potato Research**, Wageningen, v. 23, n. 2, p. 353-359, 1980. (Short Communication).
- HOOKE, W. J.. **Compendium of potato disease**. St Paul: American Phytopathological Society, 1981. 125 p.
- LIMA, J. A. Testes sorológicos para a identificação de vírus de leguminosas. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 4, n. 2, p. 215-225. jul. 1979.
- MAAT, D. Z.; HUTTINGA, H. Serology In: DE BOKS, J. A.; VAN DER WANT, J. P. H. **Viruses of potatoes and seed-potato production**. Wageningen: Pudoc, 1987. Cap. 4, p. 45-57.
- MALLOZZI, P. Sintomatologia e técnicas de laboratório na identificação de vírus. In: \_\_\_\_\_. **Tecnologia e produção de batata-semente**. Brasília: AGIPLAN-MA, 1976. p.119-123.
- MALLOZZI, P. Certificação da batata semente em relação as viroses. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 7, n. 3, p. 453-455, out. 1982.
- MALLOZZI, P. Importância da avaliação da sanidade da batata-semente e testes de pré-cultura. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 2, n. 2, p.55-67, nov. 1984.
- MARTINS, C. F. R.; LIMA, M. I.; KITAJIMA, E. W. Caracterização serológica do Rhabdovirus da mancha amarela da graviola. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.19, p. 321, ago.1994. (Suplemento-Resumo 337).
- MATTHEWS, R. E. F. **Fundamentals of plant virology**. 3 ed. New York: Academic Press, 1992. 307p.

- MIZUBUTI, A. Principais viroses da batateira sob condições de Brasil Central. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 76, n.7, p.46-50. abr. 1981.
- MOWRY, M. M. Within-Plant accumulation of Potato Leafroll Virus by Aggregated Green Peach Aphid Feeding. **Phytopathology**, Parma, v. 85, n.8, p. 859-863, Ago. 1995.
- OPGENORT, D. C.; BRAUN, A. L.. Comparative detectability of Potato Leafroll Virus, Potato X and Potato Virus S using Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) and Serologically specific Electron Microscopy (SSEM). **American Potato Journal**, Bargar, v. 64, p. 205-212. Apr. 1987. (Short Communication).
- PETERS, D. Control of virus spread. In: DE BOKS, J. A. E VAN DER WANT, J. P. H. **Viruses of potatoes and seed-potato production**. Wageningen: Pudoc, 1987. Cap. 12, p.171-174.
- PIO RIBEIRO, G.; PAZ, C. D.; ASSIS FILHO, F. M.; PIRES, C. R. C. Detecção serológica de vírus em uma coleção de batatas (*Solanum tuberosum* L.) no Estado de Pernambuco. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 19, n. 3, p. 473-475, set. 1994.
- RADCLIFF, E. B. Insect Pest of Potato. **Annual Review Entomology**, Palo Alto, v.27, p. 173-204, 1982.
- RAGSDALE, D. W.; RADCLIFF, E. B.; DiFONZO, C. D.; CONNELLY, M. S. Action threshold for an aphid vector of potato leafroll virus. In: **Advances in potato pest, biology and management**, New York: APS PRESS, 1994. p.99-123.
- SALAZAR, L. F. **Detection com ELISA de vírus de papa**. Lima: Centro Internacional de La Papa, 1993.12p. (Folheto).
- SANGAR, R.B.S.; AGRAWAL, H. O.; NAGAICH, B.B. effect of age on potato yield in plants inoculated with potato viruses X and Y. **Indian Phytopathology**, New Delhi, v. 41 n. 3, p. 327- 331, 1988.
- SANTOS, M. M. T. B.; ANDRIGUETO, J. R.; CAMARGO, C. P. **Descrição de cultivares de batata**. Brasília: Secretaria Nacional de Produção Agropecuária. Coordenadoria de Sementes e Mudas, 1986. 40 p. (Folheto).

- SEQUEIRA, I. C. Técnicas serológicas e biomoleculares de diagnóstico de vírus e viróides em plantas. **Summa Phytopathologica**, Campinas, v. 18, n. 2, p. 79-110, abr./jun. 1992.
- SHEPARD, J. F; CLAFLIN, L. E. Critical analysis of principles of seed potato certification. **Annual Review Phytopathology**, Palo Alto, v.13. p. 271-293. 1975.
- SIGVALD, R. Mature-plant resistance of potato plants against potato virus Y<sup>o</sup> (PVY<sup>o</sup>). **Potato Research**, Wageningen, v. 28, n. 2, p. 135-143. 1985.
- SILBERSCHMIDT, K.; KRAMER, M. O vírus Y, uma das principais causas da degenerescência das batatinhas no Estado de São Paulo. **O Biológico**, São Paulo, v. 8, n. 2, p. 39-46, fev. 1942.
- SIQUEIRA, O. Indexação e formação de estoque básico de batata semente. **Revista da Sociedade Brasileira de Fitopatologia**, Viçosa, v. 2, n. 2, p. 100-113, fev. 1968.
- SMITH, K. M. **Description of Plant Viruses**. Oxford: CMI/AAB, 1981. p. 230-233.
- SOUZA DIAS, J.C. A.; AMÂNCIO, A. V.; COSTA, A.S. O Vírus do enrolamento da folha da batata continua a ser a principal causa da degenerescência da batata-semente no Estado de São Paulo. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 5, n. 2, p. 136 1990. (Suplemento-Resumo).
- SOUZA DIAS, J. A. C.; COSTA, A. S. NARDIN, A. M. Potato Leafroll virus in solanaceous weeds in Brazil explains severe outbreaks of the disease in absence of known potato donor source. **Summa Phytopathologica**, Jaguariúna, v. 19, n.2, p. 80-85, jun./dez. 1993.
- SOUZA DIAS, J. C. A.; COSTA, A. S.; RAMOS, V. J. Enrolamento da folha é também praticamente o único fator de degenerescência da batata-semente no período de 1980-84 na estação experimental de Itararé- SP. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 9, n. 2, p. 405, 1984. (Suplemento-Resumo).

- SOUZA DIAS, J. A. C.; MIRANDA FILHO, H. S.; COSTA, A. S. Constatação da correlação: resistência a infecção e baixa concentração do vírus do enrolamento da folha da batata, em duas variedades criadas no IAC. **Summa Phytopathologica**, Jaguariúna, v.12, n. 1, p.34, 1990.
- TAMADA, T.; HARRISON B. D. Factors affecting the detection of potato leafroll virus in potato foliage by enzyme-linked immunosorbent assay. **Annals Applied Biology**, Wellesbourne, v. 95, n. 2, p. 209-219, July 1980.
- TAMADA, T.; HARRISON, B. D. Quantitative Studies on the Uptake and Retention of Potato Leafroll Virus by aphids in laboratory and field conditions. **Annals Applied Biology**, Wellesbourn, v. 98, n.2, p. 261-276, 1981.
- TOKESHI, H.; BERGAMIN FILHO, A.. Doenças da batata. In: GALLI, F. (coord.). **Manual de fitopatologia**. São Paulo: Ceres, 1980. v.2, p. 102-120.
- VECHI, C; HIRANO, E.; BERTONCINI. Situação da batata-semente no Brasil, **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 2, n. 2, p.55-67, nov. 1984.
- VOLLER, A.; BATTLETT, A.; BIDWELL, D.; CLARK, F.; ADAMS, A. N. The detection of viruses by Enzyme Linked Immunosorbent Assay. **Journal of General Biology**, London, v. 33, n. 1, p.165-167, 1976.
- WEIDEMANN, H. L. Importance and control of potato virus Y<sup>N</sup> (PVY<sup>N</sup>) in seed potato production. **Potato Research**, Wageningen, v. 31, n. 1, p. 85-94, 1988.
- WINTWORTH, J. L.; ALLEN, T. C.; SANSON. R. G. Evaluation of direct tissue blotting to detect potato viruses. **American Potato Journal**, New York, v. 70, n. 3, p. 257-265, Mar. 1993.

**7 ANEXO**

TABELA 1.A Incidência do PVY na haste no final do ciclo e em diferentes partes do tubérculo produzidos por plantas inoculadas aos 15 e aos 45 dias pós-emergência.

TRATAMENTOS	MÉDIAS	
	TRANSFORMADAS	MÉDIAS ORIGINAIS
Haste no final do ciclo (15 dias)	3,87*	14,98 a **
Tubérc. sem brotar (15 dias)	0,00	0,00 c
Brotos (15 dias)	3,49	12,42 a
Plântulas (15 dias)	3,26	10,64 a
Haste no final do ciclo (45 dias)	1,63	5,00 b
Tubérc. sem brotar (45 dias)	0,00	0,00 c
Brotos (45 dias)	2,26	4,77 b
Plântulas (45 dias)	2,16	4,46 b

\* Dados transformados raiz (X+0)

\*\* Média da absorbância das amostras divididos pela média da absorbância dos controles.

TABELA 2.A Incidência do PLRV na haste no final do ciclo e em diferentes partes do tubérculo produzidos por plantas inoculadas aos 15 e aos 45 dias pós-emergência.

TRATAMENTOS	MÉDIAS	
	TRANSFORMADAS	MÉDIAS ORIGINAIS
Haste no final do ciclo (15 dias)	2,80*	7,82** a
Tubérc. sem brotar (15 dias)	0,68	0,46 c d
Brotos (15 dias)	2,44	5,45 a
Plântulas (15 dias)	2,11	4,55 a b
Haste no final do ciclo (45 dias)	2,56	6,53 a
Tubérc. sem brotar (45 dias)	0,00	0,00 d
Brotos (45 dias)	0,87	0,76 b c d
Plântulas (45 dias)	1,63	0,83 a b c

\* Dados transformados raiz (X+0)

\*\* Médias da absorvância de cada amostra divididos pela média dos controles.



**APÉNDICE**

TEST	SCORE	PERCENT	GRADE
1	85	85%	B
2	78	78%	C
3	92	92%	A
4	88	88%	B
5	95	95%	A
AVERAGE	87.6	87.6%	B

TEST DATA

TEST	MINIMUM	MAXIMUM	SCORE
1	65	95	85
2	70	90	78
3	80	100	92
AVERAGE	71.7	95	87.6

**TABELA 1** Temperaturas máximas, mínimas e médias e umidade relativa mensal durante os meses de condução do experimento

ANO: 1996

MESES	T. MÁXIMA	T. MÍNIMA	T. MÉDIA	U. RELATIVA
Setembro	33,5	10,4	21,9	60,4
Outubro	38,8	18,4	28,6	58,8
Novembro	36,7	19,0	27,9	62,9
Dezembro	38,9	21,4	30,1	63,0
MÉDIAS	37,0	17,3	27,1	61,3

ANO: 1997

MESES	T. MÁXIMA	T. MÍNIMA	T. MÉDIA	U. RELATIVA
Janeiro	39,8	22,1	31,0	66,4
Fevereiro	39,2	18,3	28,8	62,2
Março	37,1	16,8	27,0	64,3
MÉDIAS	38,7	19,1	28,9	64,3