



**CARACTERIZAÇÃO BIOLÓGICA E MOLECULAR DE
ISOLADOS DO PVX (*POTATO VÍRUS X*) DO BRASIL E
TRIAGEM DE CLONES DE BATATA VISANDO
RESISTÊNCIA A ESSE VÍRUS.**

ONEIDA DE ALMEIDA SILVA

2003

ONEIDA DE ALMEIDA SILVA

**CARACTERIZAÇÃO BIOLÓGICA E MOLECULAR DE ISOLADOS DO
PVX (*POTATO VÍRUS X*) DO BRASIL E TRIAGEM DE CLONES DE
BATATA VISANDO RESISTÊNCIA A ESSE VÍRUS.**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração em Fitopatologia, para obtenção do título de "Doutor".

Orientadora

Profª. Dra. Antonia dos Reis Figueira

LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL
2003

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

Silva, Oneida de Almeida

**Caracterização biológica e molecular de isolados do PVX (*Potato Vírus X*) do Brasil e triagem de clones de batata visando resistência a esse vírus /
Oneida de Almeida Silva. -- Lavras : UFLA, 2003.**

101 p. : il.

Orientadora: Antonia dos Reis Figueira

Tese (Doutorado) – UFLA.

Bibliografia.

1. Batata. 2. Vírus. 3. Sequenciamento. 4. Molecular. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD-635.2198

ONEIDA DE ALMEIDA SILVA

**CARACTERIZAÇÃO BIOLÓGICA E MOLECULAR DE ISOLADOS DO
PVX (*POTATO VÍRUS X*) DO BRASIL E TRIAGEM DE CLONES DE
BATATA VISANDO RESISTÊNCIA A ESSE VÍRUS.**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação Agronomia, área de concentração em Fitopatologia, para obtenção do título de "Doutor".

APROVADA em 21 Fevereiro de 2003.

Prof. César Augusto Brasil Pereira Pinto	UFLA
Prof. Ricardo Magela de Souza	UFLA
Prof. Vicente Paulo Campos	UFLA
Dr . José Alberto Caram de Souza Dias	IAC

Prof. Antonia dos Reis Figueira

**UFLA
(Orientadora)**

**LAVRAS
MINAS GERAIS -- BRASIL**

**“Nada me perturbe. Nada me amedronte. Tudo passa. A paciência tudo alcança.
A quem tem Deus, nada falta. Só Deus basta.”**

(Santa Tereza D'Ávila)

**Aos meus pais José Pedro e Neide; exemplos de humildade e luta por toda a vida;
Aos meus avós José Batista, Sebastiana; Antônio e Donília (in memória)
Aos meus irmãos Ivoneide e Jusnei;**

DEDICO.

**Ao Anderson em nome do amor e companheirismo;
Ao Mário Sergio pela amizade;
Ao casal Fernando e Helena.**

OFEREÇO.

AGRADECIMENTO

A Deus, pela dádiva da vida e o saber!

À Universidade Federal de Lavras, pela oportunidade de realização deste trabalho e à FAPEMIG (Fundação de Amparo ao Estudante de Minas Gerais) pela concessão da bolsa de estudos.

À professora Antonia dos Reis Figueira pela orientação, incentivo e ensinamentos transmitidos com amizade e paciência.

À Dra. Alessandra de Jesus Boari pela orientação e sobretudo pela amizade e apoio.

Ao professor César Brasil, pela orientação, pelos ensinamentos e amizade nas horas difíceis.

Aos professores do Departamento de Fitopatologia pelos conhecimentos transmitidos.

Aos funcionários do Departamento de Fitopatologia, em especial aos amigos Carlos, Denise e Antônio Carlos, pela ajuda na condução do experimento e amizade.

Aos colegas de curso pela amizade e os bons momentos de convivência.

A Márcia, amiga insubstituível, pela amizade de longos anos.

Aos "batateiros": Eduardo, Alexandre, Ricardo, Cristiana, Gustavo e Raimundo, pela amizade e auxílio na condução do experimento.

Aos amigos que sempre me acompanharam: Cláudia, João Cândido, Jane, Cacilda, Barone e Leime.

Aos amigos da virologia: Rita de Cássia, Ellen, Rafael, Luciano, Diogo, Flávio e Vanúcia.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para o êxito deste trabalho, meu muitíssimo obrigado!

SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	i
ABSTRACT.....	ii
CAPÍTULO 1.....	01
1 Introdução Geral.....	01
2 Referencial Teórico.....	04
2.1 Cultura da batata no Brasil.....	04
2.2 PVX: importância	06
2.3 PVX- Estrutura, composição e propriedade da partícula viral.....	07
2.4 PVX: Caracterização biológica e molecular.....	08
2.5 Controle genético da resistência a viroses em batata e mecanismo de resistência ao PVX.....	11
3 Referências Bibliográficas.....	15
CAPÍTULO 2: Caracterização biológica de onze isolados de PVX (<i>Potato virus X</i>) do Brasil e sua interação com clones de batata.....	22
Resumo.....	23
Abstract.....	24
1 Introdução.....	25
2 Material e Métodos.....	28
2.1. Origem e Manutenção dos isolados.....	28
2.2 Reação de diferentes hospedeiras aos isolados estudados.....	29
2.3 Teste Sorológico DAS-ELISA.....	30
2.4 Avaliação da reação dos clones de batata OAS aos isolados de PVX.....	31
2.4.1 Avaliação dos clones de batata.....	31
3 Resultados e Discussão.....	33

3.1 Sintomatologia em plantas indicadoras inoculadas com os isolados e PVX.....	33
3.2 Análises dos clones OAS em casa-de-vegetação.....	39
3.2.1 Triagem dos clones ao PVX.....	39
3.3 Avaliação da Produção.....	44
4 Conclusões.....	47
5 Referências Bibliográficas.....	47

CAPÍTULO 3: Caracterização molecular dos onze isolados de PVX

(Potato virus X).....	51
Resumo.....	52
Abstract.....	53
1 Introdução.....	54
2 Material e métodos.....	56
2.1 Origem e Manutenção dos isolados.....	56
2.2 Caracterização Molecular.....	57
2.2.1 Purificação parcial viral.....	57
2.2.2 Extração do RNA viral.....	57
2.2.3 RT-PCR.....	58
2.2.4 Clonagem e sequenciamento.....	59
3. Resultados e Discussão.....	63
3.1 Comparação da sequência de nucleotídeos e aminoácidos da região da capa protéica dos isolados de PVX.....	63
3.2 Relação da região estudada da capa protéica com a patogenicidade do PVX.....	70
4 Conclusões.....	72
5 Referências Bibliográfica.....	73
ANEXOS.....	76

ANEXOS

ANEXO A

- TABELA 1A** Porcentagem de identidade na seqüência de nucleotídeo do gene da capa protéica entre os isolados estudados77
- TABELA 2A** Porcentagem de identidade na seqüência de aminoácidos do gene da capaprotéica entre os isolados estudados78
- TABELA 3A** Porcentagem de identidade na seqüência de nucleotídeo do gene da capa protéica entre os isolados estudados em comparação com a seqüência de outros isolados de PVX depositados no GenBank.....79
- TABELA 4A** Porcentagem de identidade na seqüência de aminoácidos do gene da capa protéica entre os isolados estudados em comparação com a seqüência de outros isolados de PVX depositados no GenBank.....80
- FIGURA 1A** Alinhamento das seqüências de nucleotídeos da capa protéica do gene dos onze isolados.....81
- FIGURA 2A** Alinhamento das seqüências de aminoácidos do gene da capa protéica dos onze isolados.....84
- FIGURA 3A** Alinhamento das seqüências de nucleotídeos do gene da capa proteica de PVX de onze isolados estudados e de isolados disponíveis no genBank.....86
- FIGURA 4A** Alinhamento da seqüências de aminoácidos do gene da capa proteica de PVX de onze isolados estudados e de isolados do genBank.....98

RESUMO

SILVA, Oneida de Almeida. **Caracterização biológica e molecular de isolados do PVX (*Potato virus x*) do Brasil e triagem de clones de batata visando à resistência a esse vírus.** Lavras: UFLA, 2003. 101p. (Tese – Doutorado em Fitopatologia).

Onze isolados de PVX, provenientes de sementes nacionais e importadas, analisadas no Centro de Indexação de Vírus de Minas Gerais (VIC, LAV, UF, NR, SJ, UDI), de São Paulo (VEL), do Rio Grande do Sul (P21 e P22), de Santa Catarina (CAN) e do Distrito Federal (BR) foram inoculados em 16 espécies de plantas hospedeiras com a finalidade de comparar a sintomatologia por eles induzida. Numa segunda etapa, foi avaliada a produtividade em campo de 48 clones de batata (nomeados OAS), pré-selecionados, provenientes do programa de melhoramento genético de batata da UFLA. Esses clones foram também submetidos à triagem para resistência ao PVX, por meio da enxertia de plantas de batata em plantas de fumo, infectadas com cada um dos onze isolados estudados, e posterior análise por DAS-ELISA. Numa terceira etapa, um fragmento do cDNA correspondente ao gene da capa protéica, de cada um dos onze isolados, obtidos por RT-PCR, foi clonado e seqüenciado para análise comparativa entre eles e com outros isolados disponíveis no banco de genes. A reação das plantas hospedeiras, aos onze isolados de PVX inoculados, foi semelhante, com exceção das espécies *Nicotiana glutinosa* e *Physalis floridana*, que se comportaram como excelentes diferenciadoras para os isolados VEL e P21, respectivamente. De um modo geral, o isolado VEL induziu sintomas mais severos que os demais isolados. Dos 48 clones de batata (OAS), testados por enxertia, 21 foram resistentes aos onze isolados de PVX. Os isolados VEL e P21 foram os mais agressivos, sendo que ambos foram capazes de infectar mais de 85% dos clones suscetíveis. Os restantes 15% foram infectados pelo isolado VIC, de modo que eles foram indicados como os isolados mais adequados para testar a resistência nos clones de batata. Todos os clones apresentaram uma produção média/planta acima de 500g, mais de 60% de tubérculos com tamanho transversal acima de 45 mm e teor de matéria seca dos tubérculos superiores a 18%, podendo então serem usados como genitores, em futuros cruzamentos dos programa de melhoramento genético de batata. O alinhamento das seqüências do gene da capa protéica, dos onze isolados, mostrou uma homologia entre eles que variou de 93 a 99% para a seqüência nucleotídica e de 94 a 100% quando se considerou a seqüência de aminoácidos. Quando esses isolados foram comparados a outros 19 isolados do banco de genes (pertencentes aos grupos 1, 2, 3 e 4), a identidade de nucleotídeos foi de 78 a 98% e a de aminoácidos de 83 a 100%. A identidade com os isolados pertencentes ao grupo 1 e 3 foi de 93 a 98%, com o grupo 2, de 79 a 80% e com o grupo 4 de 78 a 81%. A identidade de aminoácidos foi de 95 a 99% para os grupos 1 e 3, de 83 a 86% com o grupo 2 e de 88 a 91% com o grupo 4. O isolados pertencentes ao grupo 1 e 3, utilizados para comparação, foram

provenientes dos Estados Unidos, Canadá, Espanha, Rússia, Estônia e de alguns países asiáticos como China, Japão, Coreia do Sul e Taiwan. Provavelmente os onze isolados de PVX, estudados nesse trabalho, tiveram a mesma origem geográfica.

Comitê Orientador: Antonia dos Reis Figueira - UFLA (Orientadora),
Alessandra de Jesus Boari, César Augusto Brasil Pereira Pinto – UFLA

ABSTRACT

SILVA, Oneida de Almeida. Biological and molecular screening for resistance of PVX isolates (*Potato virus X*) from Brazil and potato clones to this virus. Lavras: UFLA, 2003. 102 p. (Tese – Doctor Program in Phytopathology).

Eleven PVX (*Potato virus X*) isolates coming from national and imported seeds which were analysed at the Virus Indexation Center of Minas Gerais State - Brazil (VIC, LAV, UFU, NR, SJ, UDI), and also from São Paulo (VEL), Rio Grande do Sul (P21 e P22), Santa Catarina (CAN) and Distrito Federal (BR), were first inoculated in sixteen species of host plants in order to study the plant reaction to virus infection. After that 48 potato clones from UFLA breeding program (named OAS), were evaluated in the field and also screened for PVX resistance by grafting potato plants into tobacco plants infected with each of the eleven PVX isolates. Finally a genomic fragment from the coat protein region, obtained from RT-PCR, was cloned, sequenced and analysed. The symptoms shown by the majority of host plants, inoculated with PVX isolates, were similar, but the species *Nicotiana tabacum* and *Gomphrena globosa* were considered the best indicator plants for VEL and P21 isolates, respectively. In general, the VEL isolate induced more severe symptoms in host plants than the others PVX isolates. Among the 48 OAS potato clones, 21 were resistant to all the eleven PVX isolates. VEL and P21 isolates showed higher aggressiveness and, taken together, both were able to infect 85% of the susceptible clones. The remaining 15% of susceptible clones were infected by the VIC isolate. Therefore it was suggested that, in the screening tests for PVX resistance, the potato clones could be firstly inoculated with VEL and P21 isolates. In a second stage, the potato clones resistant to both of them could be tested with VIC isolate. All the resistant clones showed tuber yield higher than 500g/plant, and the majority of them developed large tuber (major diameter bigger than 45mm) and tuber content higher than 18%, showing a good potential to be used as genitors in the UFLA potato breeding program. The nucleotide identity among the coat protein region from the eleven PVX isolates ranged from 93 to 99%, and among the amino acids ranged from 94 to 100%. When compared with PVX isolates from gene Bank (belonging to groups 1, 2, 3 and 4), the observed nucleotide identity

varied from 78 to 98% and the amino acid identity was from 83 to 100%. Considering the groups, the nucleotide identity with group 1 and 3 isolates was from 93 to 98%, with the group 2 was from 79% to 80 % and with the group 4 was 78 to 81%. The amino acid identity was 95 to 99% with group 1 and 3, 83 to 86% with group 2 and 88 to 91% with the group 4 PVX isolates. The isolates from group 1 and 3 were from USA, Canada, Spain, Russia, Estonia and from some Asiatic country such as China, Japan, South Korea and Taiwan. Probably the eleven isolates studied in this work have the same geographic origin.

Guidance Committee: Antonia dos Reis Figueira-UFLA (Major Professor), Alessandra de Jesus Boari, César Augusto Brasil Pereira Pinto –UFLA.

CAPÍTULO 1

1 INTRODUÇÃO GERAL

No Brasil a batata (*Solanum tuberosum* L.) é uma hortaliça que ocupa lugar de destaque na alimentação humana, sendo que nos últimos anos a área plantada tem variado em torno de 150 a 176 mil hectares/ano, com uma produção de 2,4 a 2,86 milhões de toneladas (AGRIANUAL, 2003). O clima brasileiro, aliado à sua área disponível para plantio, faz com que a batata seja cultivada até três vezes ao ano, garantindo uma melhor distribuição da oferta ao longo desse período. Se por um lado isso pode ser considerado uma vantagem, por outro significa que a possibilidade de disseminação e aumento do potencial de inóculo de patógenos é muito maior do que a observada nos países temperados, onde o clima permite somente um plantio ao ano e desfavorece a multiplicação de pragas e doenças durante o inverno.

∞ [Existem muitas doenças que podem afetar a cultura da batata, pois causam perdas significativas e diminuem consideravelmente a rentabilidade do agricultor. Investigações realizadas em todo o mundo, já registraram, nas regiões produtoras de batata, 40 doenças causadas por vírus (Beemster; De Bokx, 1987).] Felizmente a maioria delas não tem sido epidemiologicamente importante, de modo que, tanto no Brasil como em outros países do mundo, os vírus que mais têm sido associados a perdas nessa cultura são o vírus do enrolamento da folha (*Potato Leafroll Virus- PLRV*) e o vírus Y (*Potato Virus Y- PVY*) (Costa, 1948., Cupertino 1970; Souza Dias et al., 1983; 1985; Figueira et al., 1985; 1995; Beemster; De Bokx, 1987; Weideman, 1988; Daniels, 1995; Figueira & Pinto, 1995; 1999; Hirano, 1995; Lima, 1995).

Durante muitos anos, o PLRV era o único responsável pela

degenerescência e condenação das sementes de batata produzidas em território nacional (Costa 1948, Cupertino 1970; Souza Dias et al., 1984, Figueira et al., 1985). [Entretanto, quando o PVY passou a se tornar importante para o Brasil, devido à introdução de estirpes mais agressivas, através de sementes importadas (Figueira & Pinto, 1995, Souza Dias et al., 1995, Figueira, Pinto & Moraes, 1996, Figueira, Moraes & Pinto, 1996, Souza Dias & Tristão, 1997, Moraes & Figueira, 1999), o produtor brasileiro passou a ser onerado por novas perdas causadas por doenças viróticas. Isso tem alertado os órgãos ligados à certificação de sementes no Brasil, para a necessidade de se fazer o controle preventivo de viroses consideradas pouco importantes no momento.] O vírus S (*Potato vírus S- PVS*) e o vírus X (*Potato vírus X-PVX*) são exemplos clássicos, que têm merecido cuidados especiais por parte da legislação brasileira, devido à iminente abertura da importação de batata-semente de países da América Latina, oriunda da implantação do “Mercado Comum entre Países da América do Sul” (Mercosul). Existem evidências de que, em alguns desses países-membro do Mercosul, a incidência de PVX e mesmo de PVS nas sementes é bastante alta (Figueira, 2002).

A maioria das estirpes do PVX não induzem sintomas visíveis, sendo geralmente latentes na maioria das cultivares comerciais. O PVX não possui vetor na natureza, entretanto é facilmente transmissível de forma mecânica, podendo se disseminar rapidamente em uma cultura. As perdas causadas por ele, na planta de batata, não são muito significativas (10%), mas podem se tornar bastante expressivas se estiverem associados a outros vírus, induzindo perdas superiores a 50% da produção (Mizubuti, 1981; Hooker, 1981; Beemster; De Bokx, 1987). Por isso, apesar de atualmente o PVX não ser considerado como um dos principais vírus que causam a degenerescência da batata no Brasil, pois geralmente a batata-semente plantada

ou está isenta ou tem índices muito baixos de PVX, ele não deve ser negligenciado nos sistemas de certificação de batata-semente.

As cultivares de batata plantadas no Brasil, além de estarem sujeitas à infecção por um grande número de doenças e pragas, não são completamente adaptadas às nossas condições ambientais, fazendo com que o seu potencial produtivo seja inferior ao alcançado nos países de origem. A obtenção de cultivares nacionais resistentes às principais doenças, adaptadas às condições brasileiras de cultivo, seria a alternativa mais promissora para incrementar a produção e produtividade da batata no país.

Desse modo, os melhoristas de batata no Brasil têm buscado o desenvolvimento de novas cultivares, que tenham as características agronômicas desejáveis aliadas à resistência às principais viroses. Entretanto, apesar de o controle genético da resistência aos vírus Y e X ser bem conhecido, facilitando o planejamento para a obtenção de clones imunes, promissores para o mercado nacional, os melhoristas têm encontrado dificuldades em trabalhar com alguns isolados de vírus, principalmente do PVX (Silva et al., 2000). Isso ocorre devido à necessidade de se identificar o isolado de PVX, que está sendo utilizado para testar a resistência de uma cultivar, pois essa pode apresentar suscetibilidades diferentes para diferentes estirpes do vírus (Cockerham, 1955; Beemster, De Bokx, 1987; Chapman et al., 1992; Goulden et al., 1993; Querci et al., 1995). Torna-se necessário, portanto, uma caracterização biológica e molecular dos isolados de PVX existente no país, para direcionar os programas de melhoramento que se encontram em andamento.

O presente trabalho teve como objetivo caracterizar onze isolados de PVX, utilizando sorologia, plantas hospedeiras experimentais e o estudo comparativo de parte dos seus genomas, na região da proteína do capsídeo. Devido à baixa incidência de PVX, que geralmente tem sido observada nos campos de produção de batata no Brasil, esses isolados foram obtidos a partir de materiais nacionais e importados, analisados no laboratório do Centro de Indexação de Vírus de Minas Gerais e em entidades de ensino

e/ou de pesquisa, localizadas nos principais estados produtores de batata no país. Após esses isolados terem sido caracterizados e catalogados, foram utilizados para selecionar clones de batata imunes ao PVX, através da enxertia desses clones em topos de plantas de fumo infectadas. Os clones de batata avaliados para resistência ao PVX foram também selecionados em experimentos de campo, de acordo com a sua produção e produtividade, além das características agronômicas desejadas.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Cultura da batata no Brasil

A batata (*Solanum tuberosum* ssp. *tuberosum*) é nativa da América do Sul e desempenha importante papel na alimentação humana. Seu alto valor nutritivo, compreendido por carboidratos, vitaminas e sais minerais, bem como as suas propriedades culinárias, faz com que ela ocupe o quarto lugar entre os alimentos produzidos no mundo, sendo superada apenas pelo trigo, arroz e milho (AGRIANUAL 2003). Esta olerícola foi introduzida no Brasil por imigrantes europeus no final do século XIX e hoje é uma das espécies de maior importância econômica do país, com uma média de produção anual em torno de 2,7 milhões de toneladas, num valor estimado em R\$1,62 bilhões (AGRIANUAL, 2003). As regiões Sul e Sudeste (RS, SC, PR, SP e MG) são as principais produtoras e respondem por percentuais superiores a 96% da produção brasileira. Minas Gerais ocupa a destacada posição de primeiro estado produtor de batata, com um volume superior a 900 mil toneladas/ano, o que significa cerca de 31% da produção nacional (AGRIANUAL, 2003).

No entanto, apesar dessas estatísticas de produção, a produtividade média nacional é considerada muito baixa e apresenta uma forte instabilidade dependendo da cultivar e dos tratos culturais empregados no cultivo. Uma das razões para essa instabilidade é o fato de ser propagada vegetativamente, aliado ao clima tropical

X
brasileiro, que favorece a ocorrência de doenças e pragas durante todo o ano. Considerando que, após poucas gerações de multiplicação vegetativa no campo, os índices de incidência de vírus podem atingir valores bastante elevados, torna-se inviável a re-multiplicação de uma semente básica por mais do que duas a três vezes, tornando-se necessária a aquisição de novo estoque de batata-semente pelo produtor. Isso tem sido observado em todas as regiões de plantio, desde que se começou a cultivar batata no Brasil (Puttemans, 1934; Costa 1948; 1965; Souza Dias et al., 1984; Cupertino & Costa, 1970; Souza-Dias, 1995; Figueira, 1995; Daniels, 1995; Hirano, 1995; Lima, 1995). Desse modo, as sementes de batata, que são geralmente importadas de países da Europa e também dos Estados Unidos e Canadá, representam atualmente mais de 20% do custo de produção (AGRIANUAL 2003).]

Devido ao alto custo das sementes importadas, muitos produtores utilizam sua própria batata-semente, advinda de grande número de multiplicações sucessivas, o que acarreta o aumento da fonte de inóculo e a conseqüente aceleração da degenerescência das sementes durante a sua multiplicação no campo. Agravando esse problema de degenerescência, as cultivares estrangeiras como a Monalisa, Bintje, Achat, Atlantic, e outras, que juntas ocupam a maioria da área cultivada, às vezes apresentam problemas de adaptação às condições ecológicas brasileiras, principalmente referentes ao ciclo (sensibilidade ao fotoperíodo), exigindo altas doses de fertilizantes para uma boa produtividade. Além disso, essas cultivares importadas apresentam dormência longa, dificultando plantios consecutivos e contribuindo para a instabilidade da cultura e, conseqüentemente, para o seu alto custo de produção (Pereira, 2000). O desenvolvimento de cultivares brasileiras, mais adaptadas ao clima e resistentes aos principais vírus que afetam a cultura da batata, representaria um grande avanço para esse setor.

2.2 PVX: importância

No Brasil o PVX nunca foi associado a perdas significativas na cultura da batata. É importante considerar, no entanto, que o fato do PVX não estar causando perdas na produção da batata no Brasil, não significa que ele não seja capaz de afetar a produção, mas sim que normalmente se encontra ausente ou em incidências bastante baixas, na maioria dos campos produtores (Danniels, 1995, Souza-Dias, 1995; Figueira, 1995). Por isso, há poucos estudos conduzidos para se avaliarem as perdas, provocadas por esse vírus nas diversas cultivares de batata. Sabe-se, porém, que as cultivares normalmente plantadas no Brasil têm sido suscetíveis ao PVX. O trabalho de Câmara et al. (1986) ilustra bem a importância desse vírus no campo, onde esses autores observaram que tubérculos da cultivar Desirée, que apresentavam 10% de incidência de PVX na terceira geração, terminaram com 35% de incidência na nona geração.

No entanto, perdas maiores já foram observadas em outras partes do mundo. Wilson & Jones (1990) avaliaram a incidência desse vírus na batata, na semente produzida na Austrália, em duas regiões, na safra 1987/88. Em Albany, dos 14 produtores avaliados, apenas um colheu tubérculos, da cv. Delaware, com 20% de incidência de PVX, sendo que os treze demais produtores colheram tubérculos, dessa mesma cultivar, com incidências de PVX que variaram de 92 a 100%. Os índices na cv. Kennbek foram bem menores, variando de 1 a 20%, mostrando que a disseminação de PVX no campo depende, dentre outros fatores, da suscetibilidade da cultivar. Na outra avaliação feita na região metropolitana de Perk, a incidência de PVX variou também com a cultivar de batata, mas foi de 95 a 100% na maioria das cultivares mais suscetíveis, como Delaware e Pontiac.

Sabe-se, pois, que tanto a velocidade de disseminação de PVX no campo e o seu efeito na planta de batata dependem das estirpes do vírus, das cultivares e

do sinergismo com outros vírus. Theodoluz et al., (1992) observaram que 99,2% dos tubérculos do banco de germoplasma de batata da Universidade Austral do Chile estavam infectados com vírus, sendo que 2,6% estavam infectados somente por PVX. Nos demais tubérculos que apresentaram infecção mista, entretanto, essa porcentagem foi de 12,3% de PVX e PVY, 4% de PVX e PVS e 34% de PVX, PVY e PVS. Isso mostra que no Brasil é fundamental a utilização de sementes livres de PVX, principalmente porque a incidência do PVY tem aumentado nesses últimos tempos, o que potencializa o risco de aumento da severidade nas perdas de produção devido às infecções mistas.

Como nem sempre é possível evitar a entrada de sementes infectadas, principalmente no Brasil, que depende muito de sementes importadas e que está expandindo suas fronteiras através do Mercosul, o desenvolvimento de cultivares nacionais resistentes e adaptadas ao clima brasileiro, representa uma alternativa promissora para o controle preventivo do PVX no país.

2.3 PVX Estrutura, composição e propriedades da partícula viral

O vírus X da batata (PVX), membro tipo do gênero *Potexvirus*, apresenta partículas alongadas e flexuosas contendo cerca de 6% de ácido nucléico e 94% de proteína, com um tamanho de 470 - 480 nm de comprimento por 13 nm de diâmetro. A proporção de bases em suas partículas é 22% G, 32% A, 24% C e 22% de U (Brunt et al., 1996). O genoma do PVX é constituído por RNA de fita simples, diretamente traduzível (+ssRNA) com 6435 nucleotídeos. Este possui uma sequência líder, não traduzível (líder α - β), constituída por 83 nucleotídeos, que parece estar envolvida na eficiência do processo de tradução, apresenta uma sequência de guanina metilada (M7g) ligada à extremidade 5'-terminal e uma cauda poli-A na extremidade 3'.

O RNA genômico possui 5 ORFs, sendo que na ORF 1, localizada no

terminal 5', encontra-se o gene da RNA polimerase que é traduzido funcionalmente como monocistrônico, produzindo uma proteína de 166 kDa. A ORF 5, localizada no terminal 3', codifica a capa protéica, que em algumas estirpes de PVX é glicosilada. Entre a ORF 1 e a ORF 5 encontra-se um bloco de genes com três ORFs sobrepostas, que tem sido denominado de bloco triplo, que codifica as proteínas 25 kDa, 12kDa e 8 kDa, envolvidas no movimento do vírus célula-célula (Regenmortel et al, 2000). A proteína capsial (CP) é o produto gênico mais estudado dos *Potexvirus*, pois é muito utilizada nas diferenciações e classificações de estirpes de PVX (Fedorkin et al; 2000).

Existem diversos variantes genéticos do PVX, que podem ser diferenciados pelos sintomas provocados em plantas de fumo, por sorologia, pela sua infectividade em diferentes variedades de batata e também pelo seu ponto de inativação térmica (Berks, 1970). As propriedades da partícula do PVX no extrato vegetal, provenientes de folhas de fumo infectadas são: temperatura de inativação térmica (TIP): entre 68 e 76 °C dependendo da estirpe; ponto final de diluição (DEP): entre 10^5 e 10^6 ; longevidade "in vitro" (LIV) a 20 °C: várias semanas, sendo que na presença de glicerol pode permanecer infectivo por mais de um ano (Berks, 1970).

2.4 PVX: Caracterização biológica e molecular

O PVX geralmente provoca infecções latentes, não causando sintomas na maioria das cultivares comerciais de batata. Em algumas cultivares suscetíveis pode provocar mosaico internerval, e esse sintoma depende da cultivar, da estirpe do vírus e das condições ambientais. Em baixas temperaturas, os sintomas são mais evidentes que em temperaturas superiores a 22 °C. Quando associado a outros vírus, como o PVA ou o PVY, ocorre um sinergismo, de modo que induzem sintomas mais expressivos, podendo as estirpes mais severas provocarem rugosidade e

encrespamento das folhas (Berks, 1970; Beemster; De Bokx, 1987).

Apesar do vírus X não ter vetor na natureza, ele é facilmente transmitido por contato entre plantas sadias e infectadas, por operações mecânicas durante o transporte, plantio, colheita e classificação, por roupas, armazenamento durante a fase de desenvolvimento dos brotos, fungos de solos, contato com animais e também insetos raspadores e/ou mastigadores, apresentando alta infectividade (Berks, 1970; Beemster; De Bokx, 1987). A exemplo do que acontece com outros fitovírus, o PVX é capaz de sobreviver indefinidamente em células hospedeiras vivas (Matthews, 1991), de modo que, uma vez presente, esse pode permanecer infectivo nos tubérculos enquanto eles mantiverem a sua capacidade fisiológica de brotação.

O PVX apresenta uma gama limitada de hospedeiras, principalmente dentro da família Solanaceae, embora ocorram também algumas hospedeiras em outras famílias como Amaranthaceae e Chenopodiaceae (Berks, 1970; Beemster; De Bokx, 1987). Plantas de fumo (*Nicotiana tabacum* L.) reagem ao PVX com anéis, clareamento das nervuras e mosqueado e são bastante utilizadas para multiplicação do PVX para purificação. *Datura stramonium* apresenta sintoma sistêmico de mosaico quando infectada com PVX e, como é imune ao PVY, é uma planta frequentemente empregada para separar esse vírus em infecções mistas (Beemster; De Bokx, 1987). Plantas de pimentão (*Capsicum annuum*) mostram lesões locais redondas, necróticas, bastante características (Berks, 1970; Beemster; De Bokx, 1987).

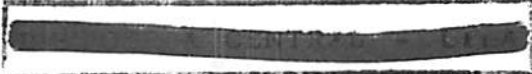
A espécie *Gomphrena globosa*, por reagir com lesões locais em forma de anéis com halo avermelhado, facilmente identificáveis, é a hospedeira mais utilizada como planta indicadora para todas as estirpes do PVX, exceto para a X_{HB} (Hooker, 1981; De Boks & Van der Want, 1987). Essa planta não é muito utilizada para a separação entre estirpes proximalmente relacionadas, pois todas elas tendem a provocar o mesmo

tipo de sintoma.

Com o desenvolvimento de novas técnicas em biologia molecular, como PCR, hibridização com cDNA e sequenciamento genético, surgem novas alternativas que possibilitam uma classificação mais acurada de isolados virais. Com base no grau de homologia entre as seqüências nucleotídicas, Querci et al. (1993), compararam a seqüência de nucleotídeos da estirpe PVX_{HB} com outros isolados de PVX (PVX_S e PVX_{CP}) e observaram elevados níveis de similaridade nas seqüências da proteína da capa, com poucas diferenças limitadas a um pequeno número de resíduos.

Butzonitch et al. (1996) estudaram o comportamento de clones de batata quando inoculados com diferentes isolados de PVX e PVY^N, oriundos da Argentina, e com isolados de PVX e PVY^O originários do Uruguai. Eles verificaram que isolados de PVX da Argentina induziram sintomas em 33% das plantas avaliadas, enquanto que os isolados do Uruguai induziram sintomas em apenas 21% dessas plantas. Os autores concluíram que os isolados da Argentina foram mais eficientes do que os isolados de Uruguai para identificar e selecionar os genótipos resistentes aos vírus testados.

Querci et al. (1995), trabalhando com cultivares de *S. tuberosum* e as espécies selvagens *S. acaule* e *S. sucrense* e diferentes estirpes de PVX, originárias de várias localidades do Peru e Bolívia, verificaram que o clone OCH-11926 de *S. sucrense* foi resistente aos isolados de PVX comum e PVX_{HB}, porém suscetível aos isolados mutantes (KB-TK e CP4-KR). O mutante KB-TK é derivado da estirpe PVX_{HB} e o CP4-KR é derivado da estirpe PVX_{CP4}, por meio de mutação de ponto em dois aminoácidos (121 e 127) na proteína da capa do vírus. Portanto, pode-se verificar que a mutação ocorrida na seqüência de aminoácidos da capa protéica do vírus foi suficiente para quebrar a resistência da planta de batata. Por outro lado, alguns autores (Feigelstock et al., 1995; Querci et al., 1995; Watts et al., 1997)



acreditam que a patogenicidade do PVX não está limitada a uma única mudança no aminoácido e sugerem que outras regiões do genoma do vírus, além do gene da proteína da capa, podem estar envolvidas na interação vírus-hospedeiro.

Considerando-se os dados descritos na literatura, percebe-se que a diferenciação dos isolados de PVX é muito importante para os programas de melhoramento genético de batata, pois genótipos resistentes a um isolado específico podem ser suscetíveis a outro e vice-versa.

2.5 Controle genético da resistência a viroses em batata e mecanismos de resistência ao PVX

A batata (*Solanum tuberosum* ssp. *tuberosum*) é uma espécie autotetraplóide, de herança tetrassômica (Mihovilovich, 1996), podendo apresentar, para cada loco gênico, cinco constituições diferentes, em função do número de alelos dominantes: AAAA-quadriplex; AAAa-triplex; AAaa-duplex; Aaaa-simplex e aaaa-nulplex. As reações de hipersensibilidade e imunidade são controladas por genes maiores que atuam já na condição simplex. Porém, em cruzamentos com cultivares suscetíveis (nulplex), produzem apenas 50% de descendentes imunes. A maior parte dos genes maiores atua de forma não específica para as estirpes e, até o momento, não se observou quebra de resistência pelos diferentes vírus (Ross, 1986).

O aumento da frequência de alelos de resistência permite, primeiramente, identificar genitores simplex imunes e posteriormente os duplex. O intercruzamento de clones duplex permite a obtenção de genótipos imunes triplex e quadriplex. Essas combinações genéticas têm implicações direta nos métodos de melhoramento da batata (Pereira, 2000), pois genitores, com diferentes constituições genéticas podem gerar diversas proporções de descendentes com resistência ou suscetibilidade às viroses.

Várias formas de resistência às viroses têm sido descritas para a batata,

tais como:

a) Resistência à infecção: controlada por genes menores (poligenes), exige que ambos os pais possuam pelo menos um nível intermediário de resistência. Um genitor, com resistência pronunciadamente baixa, diminui consideravelmente o nível de resistência da progênie (Ross, 1986);

b) Resistência associada à intolerância: caracterizada por apresentar necrose em grande parte da planta quando infectada no campo.

c) Resistências associadas à hipersensibilidade ou à imunidade: ambas podem ser diferenciadas pela enxertia em uma planta infectada por vírus. O primeiro tipo mostra necrose na parte área do enxerto. Já no caso de imunidade, ou não aparecem sintomas nas plantas, ou ocorre necrose de pontos nas folhas superiores (Ross, 1986). Quando a planta é imune o vírus não consegue se replicar na célula da planta nem mesmo após a enxertia de uma planta imune em uma planta infectada. Não há alteração da proteção imune por ação de fatores climáticos, como se observa nos outros tipos de resistência (Salazar, 1982).

O melhoramento genético, visando à resistência ao PVX, é baseado nos tipos de resistência à infecção, já citados, ou seja hipersensibilidade localizada e imunidade. A resistência à infecção, em algumas cultivares, pode alcançar níveis muito altos. Todavia deve-se reconhecer que, em cruzamento, "seedlings" altamente resistentes surgem somente quando ambos os pais possuem o mesmo nível elevado de resistência. Por outro lado, os genes de hipersensibilidade são específicos para cada grupo de estirpes do PVX (Ross, 1986).

As cultivares de batata podem apresentar diferenças significativas na sua resistência ao PVX, dependendo do isolado viral testado. Cockerham (1955,1970) encontrou em batata dois genes para hipersensibilidade ao PVX, que denominou de N_x e N_b , específicos para as estirpes. Cultivares contendo diversas combinações desses genes foram empregadas para selecionar quatro grupo de estirpes: o genótipo $n_x n_b$ é suscetível aos quatro

grupos de estirpes; o $N_x n_b$ é suscetível aos grupos 2 e 4 e resistente aos grupos 1 e 3, o $n_x N_b$ é suscetível aos grupos 3 e 4 e resistente aos grupos 1 e 2 e o genótipo $N_x N_b$ é suscetível apenas ao grupo 4 e resistentes aos demais. É interessante notar que todos os genótipos foram suscetíveis ao grupo de estirpes 4.

Genes em acessos de *S. tuberosum* ssp. *andigena* (Schultz & Raleigh, 1933, citados por Ross, 1986; Cokerham, 1970) e em *S. acaule* (Ross, 1986), denominados Rx, que apresentam alta resistência a PVX, têm sido identificados e empregados em programas de melhoramento de países tradicionais em produção e exportação de batata-semente como em Holanda (Regenmorte et al., 2000). Brown et al. (1984) detectaram uma possível fonte de resistência em *S. sucrense*, para uma estirpe denominada PVX_{HB}, descrita por Moreira et al. (1980), que é capaz de infectar cultivares hipersensíveis e resistentes.

Em geral, as estirpes de PVX, pertencentes ao grupo 1, não quebram a imunidade da batata conferida pelos genes dominantes Rx, Rx_{edg} e Rx_{chl} de *S. tuberosum* ssp. *tuberosum*, *S. tuberosum* ssp. *andigena* e *S. acaule*, respectivamente. Por outro lado, o patótipo HB, presente somente na área de Titicaca na Bolívia, quebra essa imunidade (Mendoza, 1994). Entretanto, resistência relativa ao PVX_{HB} encontrada nas cultivares Bzura e Atlantic, constitui, portanto, um atributo adicional à imunidade contra outros biotipos de PVX (Querci et al., 1995).

O gene Rx originado da cultivar chilena Villaroela (ssp. *tuberosum*) foi introduzido nas cultivares americanas, Atlantic, Carlton, Jemsec, Reliance, Saco, Shoshoni e Tawa por meio da linhagem melhorada América 41956 (Ross, 1986 e Mendoza (1990). Os genes Rx1 e Rx2 foram localizados no cromossoma XII e V da batata e conferem imunidade a todas as estirpes dos quatro grupos de PVX, com exceção da estirpe PVX_{HB} (De Jong et al., 1997).

Existem evidências de que a resistência mediada pelo gene Rx é induzida quando o produto desse gene interage direta ou indiretamente com a capa da proteína viral de todos os isolados naturais do PVX, exceto com a estirpe PVX_{HB} (Kavanagh et al., 1992; Kohn et al., 1993). Santa Cruz & Baulcombe (1995), estudando oito estirpes de PVX, localizaram 14 posições de aminoácidos na capa protéica viral que permitiram separá-los em dois grupos: grupo X, que foram avirulentos para cultivares carregando o gene Nx e tipo B que foram capazes de superar a resistência conferida por esse gene.

Algumas outras evidências reforçam a hipótese de que a capa protéica do PVX está envolvida na virulência da estirpe. Santa Cruz & Baulcombe (1995) mostraram que a substituição de um único aminoácido, a glutamina, na posição 78 da capa protéica altera a interação de estirpes de PVX com cultivares portadoras do gene de resistência Nx. Resultados obtidos por Goulden et al. (1993) mostraram que a interação com cultivares portadoras do gene Rx é mediada pela proteína do capsídeo do PVX, em vez do RNA genômico que a codifica, pois a resistência foi induzida somente quando o aminoácido da posição 121 era a treonina. Köhn et al. (1993) obtiveram resultados semelhantes, mostrando que a capa protéica induz a resistência mediada pelo gene Rx e que esse mecanismo de resistência foi efetivo contra vírus não relacionados como o vírus do mosaico do pepino (*Cucumber mosaic virus* - CMV). Esse aminoácido é conservado em todos os PVX, com exceção do PVX_{HB} (Skryabin et al., 1988; Huisman et al., 1988; Osman et al., 1990; Kavanagh et al., 1992).

Goulden & Baulcombe (1993) mostraram que existe um componente homólogo, em cultivares de batata portadoras do gene Rx e em *Gomphrena globosa*, que interage com a estrutura da capa protéica do PVX e, após a interação, ativa uma resposta induzida na célula da planta.

Bendahmane et al. (1995), utilizando mutações em posições específicas localizadas na capa protéica do PVX, concluíram que a resistência mediada pelo

Rx é elicitada pelo gene da capa protéica, independentemente de outras proteínas codificadas pelo PVX. Entretanto, existem alguns autores que, baseando-se em suas evidências experimentais, defendem a hipótese de que esse mecanismo de resistência poderia estar ligado a mais de um, ou pelo menos um determinante que não se encontra na capa protéica do PVX (Querci et al., 1995; Feigelestock, et al., 1995; Watts et al., 1997).

O aparecimento das diferentes estirpes de PVX pode ocorrer devido, principalmente, a dois tipos de evento: o primeiro seria a recombinação entre estirpes e o segundo a evolução independente de pelo menos um determinante de virulência ou avirulência. Malcuit et al. (2000) analisaram a seqüência completa de seis isolados virais, contendo representantes dos quatro grupos de estirpes de PVX e concluíram que não havia nenhuma evidência de recombinação entre eles.

3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRIANUAL - Anuário da Agricultura Brasileira. São Paulo: FNP Consultoria, 2003.

BEEMSTER, A. B. R.; DE BOKX. Survey of properties and symptoms. In: De BOKX, J. A.; Van Der WANTS, (Ed.). Viruses of potato and seed potato production. 2. ed. Wageningen: Pudoc, 1987. p. 84-113.

BENDAHMANE, A.; KOHN, B. A.; DEDI, C.; BAULCOMBE, D. C. The coat protein of potato virus X is a strain-specific elicitor of Rx1-mediated virus in potato. Plant Journal, Norwich, v. 8, n. 6, p. 933-941, Dec. 1995

BERCKS, R. Potato virus X. Kew: Commonwealth Mycological Institute/Association of Applied Biologists, 1970. 4 p. (Descriptions of Plant Viruses, 4).

BROWN, C. R.; SALAZAR, C. F.; OCHOA, C. et. al. Strain specific immunity to PVX_{HB} is controlled by a single dominant gene. In: TRIENNIAL CONFERENCE EUROPEAN ASSOCIATION POTATO RESEARCH, 9., 1984, Interlaken. Conference.... Interlaken, Switzerland: EAPR, 1984.

BRUNT, A. A.; CRABTREE, K.; DALLWITZ, M. J.; GIBBS, A. J.; WATSON, L.; ZURCHER, E. J. (Ed.) (1996 onwards). 'Plant viruses' Online: Descriptions and Lists from the VIDE Database.

BUTZONITCH, I.; COLAVITA, M.; CAPEZO, S.; et al. Behavior of local isolets of PVX and PVY in the screening for resistance of potato virus X and Y. *Revista de la Facultad de Agronomía la Plata, Balcare*, v. 101, n. 2, p. 127-132, nov. 1996. (Resumo).

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

CHAPMAN, S.; HILLS, G.; WATTS, J. BAULCOMBE, D. Mutational analysis of the coat protein gene of potato virus X: Effects on virion morphology and viral pathogenicity. *Virology, Orlando*, v. 191, n. 1, p. 223-230, Nov. 1992.

COCKERHAM, G. Genetical studies on resistance to potato viruses X and Y. *Heredity, Edinburgh*, v. 25, n. 6, p. 309-348, 1970.

COCKERHAM, G. Strains of potato virus X. In: CONFERENCE ON POTATO VIRUS DISEASES, 2., 1954, Lisse-Wagening. *Proceedings...* Lisse-Wagening, 1954. p. 89-92, 1955.

COSTA, A. S. Doenças de vírus do fumo, batata e tomateiro. *Boletim do Ministério da Agricultura, Rio de Janeiro*, v. 37, n. 1/3, p. 1-82, 1948.

COSTA, A. S. Moléstias de vírus da batata. *Boletim do Campo, Campinas*, v. 21, n. 6/7, p. 68-83, jun./jul. 1965.

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

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

DE BOKX, J. A.; VAN DER WANT, J. P. H. *Viruses of potatoes and seed-potato production*. Wageningen: Pudoc, 1987. 259 p.

- DE JONG, W.; FORSYTH, A.; LEISTER, D.; GEBHART, C.; SALAMINI, W. A potato hypersensitive resistance gene against potato virus X maps to a resistance gene cluster on chromosomes. *Theoretical Applied Genetic*, Berlin, v. 95, n. 5/6, p. 246-252, Oct. 1997.
- FEDORKIN, O. N.; MERIS, A.; LUCCHESI, J.; SOLOVYEV, A. G.; SAARMA, M.; MOROZOV, S. Y.; MAKINEN, K. Complementation of the movement-deficient mutations in potato Virus X: *Potyvirus* coat protein mediates cell-to-cell trafficking of C-terminal truncation but not deletion mutant of *Potexvirus* coat protein. *Virology*, Orlando, v. 270, n. 1, p. 31-42, Nov. 2000.
- FEIGELSTOCK, D. A.; TOZZINI, A. C.; HOPP, H. E. Coat protein sequence of a resistance-breaking strain of potato virus X isolated in Argentina. *Virus Genes*, Moron, v. 10, n. 3, p. 289-292, 1995.
- 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).
- FIGUEIRA, A. R. Viroses da batata e suas implicações na produção da batata-semente do estado de Minas Gerais: histórico do problema e soluções. *Summa Phytopathologica*, Piracicaba, v. 21, n. 3/4, p. 269-270, jul./dez. 1995.
- FIGUEIRA, A. R. Viroses da Batata: situação atual e perspectivas futuras. *Informe Agropecuário*, Belo Horizonte, v. 20, n. 197, p. 86-96, 1999.
- FIGUEIRA, A. R. Vírus S (*Potato virus S-PVS*), Vírus X (*Potato virus X-PVX*): Qual seria a sua importância para a bataticultura brasileira? *Batata Show*, Itapetininga, v. 2, n. 4, p. 8-11, maio 2002.
- FIGUEIRA, A. R.; MORAES, F. R.; PINTO, A. C. S. New PVY necrotic strain is causing great losses in Brazil. *Phytopathology*, Sant Paul, v. 86, n. 11, p. S85. Nov. 1996a.
- FIGUEIRA, A. R.; PINTO, A. C. S.; MORAES, F. H. R. Alta incidência da nova estirpe necrótica do PVY esta ocorrendo em todos os estados produtores do Brasil. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v. 21, p. 432, ago. 1996b. (Suplemento).
- FIGUEIRA, A. R.; SOUZA, P. E.; CARDOSO, M. R. O. et al. Ocorrência dos vírus que infectam a batateira na região Sul de Minas Gerais. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v. 10, n. 2, p. 307, jun. 1985. Resumo.

QUERCI, M.; SALAZAR, L. F.; FERNANDEZ-NORTHCOTE, E. N. Detection of Andean Potato Virus X Isolates by radioactive and nonradioactive nucleic spot hybridization tests. *Molecular Plant Pathology*, Wageningen, v. 83, n. 2, p. 171-176, Feb. 1993.

REGENMORTEL, M. H. V. Van.; FAUQUET, C. M.; BISHOP, D. H. L.; CARSTENS, E. B.; ESTES, M. K.; LEMON, S. M.; MANILOFF, J.; MAYO, M. A. *Virus taxonomy: Genus Potexvirus*. San Diego: Academic Press, 2000. p. 975-981. Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Virus.

ROSS, H. *Potato breeding: problems and perspectives*. Berlin: Verlag Paul Parey, 1986. 132 p.

SALAZAR, L. F. *Enfermidades virosas de la papa*. Lima: Centro Internacional de la papa, 1982. 111 p.

SANTA CRUZ, S.; BAULCOMBE, D. Analysis of potato virus X coat protein genes in relation to resistance conferred by the genes Nx, NB and Rx1 of potato. *Journal General Virology*, Norwich, v. 76, n. 8, p. 2057-2061, Aug. 1995.

SILVA, O. A. Identificação de clones de batata imunes ao PVX e PVY, adaptados à região Sul de Minas Gerais. *Summa Phytopathologica*, Piracicaba, v. 26, n. 4, p. 297-300, out./dez. 2000.

SOUZA DIAS, J. A. C.; COSTA, A. S. Método "cova/pré-plantio" na seleção da batata-semente. São Paulo: Fundação Cargill, 1984. 68 p.

SOUZA DIAS, J. A. C.; COSTA, A. S.; ASANO, E. M. Elevada incidência (80%) de sintomas semelhantes ao enrolamento secundário em infecção primária de batatal de semente importada. *Summa Phytopathologica*. Piracicaba, v. 11, n. 1/2. p. 55-56, Jan./June 1985.

SOUZA DIAS, J. A. C.; COSTA, A. S.; MIRANDA FILHO, H. A. Sintomas da infecção primária causada pelo vírus do enrolamento da folha da batata: uma revisão. *Summa Phytopathologica*, Piracicaba, v. 9, n. 1/2, p. 80-81, Jan./June 1983.

SOUZA DIAS, J. A. C.; TRISTÃO, J. F. Rise of PVY incidence in seed potato regions of São Paulo State (Brazil) associated with the introduction of Atlantic potatoes. *American Potato Journal*, Orano, v. 74, n. 6, p. 469, Nov./Dec. 1997.

SOUZA DIAS, J. A. C.; TRISTÃO, J. F.; MIRANDA, H. S. Vírus Y da batata-semente cv. Atlantic: alteração na epidemiologia da virose em São Paulo e Paraná. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v. 20, p. 30, ago. 1995. Resumo.

SKRYABIN, K. G.; KRAV, A. S.; MOROZOV.; ATABEKOV, J. G.; LUKASHEKA, L. I. The nucleotide sequence of potato virus X RNA. *Nucleic Acids Research*, Oxford, v. 16, n. 22, p. 10929-10930, Nov. 1988.

THEODOLUZ, R. Virus content of seed potato stocks produced in a unique seed potato production scheme. *American Potato Journal*, Orano, v. 66, n. 8, p. 449-459, Aug. 1992.

WATTS, N. R.; SINGH, M.; SINGH, R. P. Potato virus X isolates from potato collected in eastern canada with different symptoms in tobacco differ in their coat proteins. *American Potato Journal*, Orano, v. 74, n. 4, p. 245-253, July/Aug. 1997.

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

WILSON, C. R.; JONES, R. A. C. Virus content of seed potato stocks produced in a unique seed potato production scheme. *Journal Applied Biology*, New Brunswick, v. 116, n. 1, p. 103-109, Feb. 1990.

150
50 100
400
1000

178

Handwritten notes on the left side of the page, including a list of numbers and some illegible text.

M
J
J
A
S
N
D

Handwritten notes on the right side of the page, including a list of numbers and some illegible text.



Handwritten notes and calculations in the lower right quadrant, including the number '21'.

Handwritten notes and calculations at the bottom left, including the number '21' and various numbers.

CAPÍTULO 2

CARACTERIZAÇÃO BIOLÓGICA DE ONZE ISOLADOS DE PVX (*POTATO VIRUS X*) DO BRASIL E SUA INTERAÇÃO COM CLONES DE BATATA (*Solanum tuberosum* L.)

RESUMO

SILVA, Oneida de Almeida. Caracterização biológica de onze isolados de PVX (*Potato virus X*) do Brasil e sua interação com clones de batata (*Solanum tuberosum* L.) Lavras: UFLA, 2003. 22 - 50p. (Tese-Doutorado em Fitopatologia).

Esse trabalho foi realizado com onze isolados de PVX, sendo seis do Centro de Indexação de Vírus Minas Gerais (VIC, LAV, UF, NR, SJ, UDI), um de São Paulo (VEL), dois do Rio Grande do Sul (P21 e P22), um de Santa Catarina (CAN) e um do Distrito Federal (BR). Foi feita a inoculação mecânica desses isolados em duas épocas diferentes, em hospedeiras diversas, para verificação da sua agressividade e sintomatologia induzida nos hospedeiros, com a finalidade de se fazer a diferenciação dos mesmos. Foi também avaliada a reação de 48 clones de batata (nomeados OAS), provenientes do Programa de Melhoramento de Batata da UFLA, aos 11 isolados estudados, e a sua produtividade em campo, visando selecionar material com resistência a PVX e com boa produtividade. Os sintomas induzidos pelos isolados de PVX na maioria das plantas foram semelhantes, com exceção de *Nicotiana glutinosa* e *Physalis floridana*, que se revelaram ótimas diferenciadoras para os isolados VEL e P21, respectivamente. Apesar de semelhantes, os sintomas induzidos pelo isolado VEL, nas outras indicadoras testadas, tenderam a ser mais severos. Dos 48 clones OAS avaliados, por enxertia em plantas de fumo infectadas com os isolados de PVX e posterior avaliação por DAS-ELISA, 27 foram suscetíveis e 21 foram resistentes. Esses clones apresentaram uma produção média por planta acima de 500g, tamanho médio dos tubérculos acima de 45mm e teor de matéria seca superior a 18%, mostrando-se como excelentes genitores para serem empregados no programa de melhoramento de batata da UFLA. Os isolados VEL e P21 infectaram mais de 85% dos clones suscetíveis, e o VIC infectou os restantes. Com base nesses resultados, propõe-se que os futuros testes para resistência, em clones de batata, sejam feitos utilizando-se primeiramente os isolados VEL e P21 e os clones que se mostrarem resistentes a eles, sejam reavaliados utilizando-se o VIC. Desse modo pode-se economizar mão-de-obra e obter uma boa eficiência na seleção de clones resistentes ao PVX, a serem empregados ao programa de Melhoramento de Batata.

Comitê Orientador: Antonia dos Reis Figueira – UFLA (Orientadora),
Alessandra de Jesus Boari, César Augusto Brasil Pereira Pinto – UFLA.

ABSTRACT

SILVA, Oneida de Almeida. Biological characterization of PVX isolates (*Potato virus X*) from Brasil and its interaction with potato clones (*Solanum tuberosum*). Lavras: UFLA, 2003. 22-50p. (Doctor Program in Phytopathology).

This work was accomplished with eleven PVX isolates: six from national and imported seeds analysed at the Virus Indexation Center of Minas Gerais-Brazil (VIC, LAV, UF, NR, SJ, UDI), one from São Paulo state (VEL), two from Rio Grande do Sul state (P21 and P22), one from Santa Catarina state (CAN) and one from Federal District (BR). These PVX isolates were mechanically inoculated in several plant hosts, in two different seasons, to verify the aggressiveness and host symptoms. It was also evaluated the reaction of 48 potato clones, from the potato breeding program of UFLA (Universidade Federal de Lavras-MG-Brazil), named OAS, to these eleven PVX isolates, as well their field performance, aiming to choose the most productive and resistant clones. The symptoms shown by the majority of host plants, when inoculated with the eleven isolates were similar, but *Nicotina glutinosa* and *Physalis floridana*, showed distinct symptoms and were considered the best indicator plants for the VEL and P21 PVX isolates, respectively. In general, the symptoms induced by the VEL isolate in all the tested host plants were more severe. Among the 48 OAS clones, which were evaluated by grafting into tobacco plants infected with PVX isolates and checked by DAS-ELISA, 27 were susceptible and 21 were resistant. These resistant clones presented yield higher than 500g/plant, the major diameter of tubers bigger than 45mm and dry matter tuber content higher than 18%. Therefore these clones showed a good potential to be use as genitors in the UFLA breeding program. The VEL and P21 isolates infected more than 85% of the 21 susceptible potato clones and VIC infected the clones which were resistant to both of them. Based on this results, it was suggested that the potato clones could firstly be screened for PVX resistance with VEL and P21, and than the resistant ones could be tested with VIC isolate. Using this procedure the potato breeding programs could save hand labor with a good efficiency in the selection of PVX resistant clones.

Guidance Committee: Antonia dos Reis Figueira (Major Professor), Alessandra de Jesus Boari, César Augusto Brasil Pereira Pinto.

1 INTRODUÇÃO

A batata ocupa um papel cada vez mais importante na alimentação humana e, também, no Brasil, o seu consumo per capita tem aumentado, sendo que nos últimos anos a média anual de área plantada tem girado em torno 2,7 milhões de toneladas (AGRIANUAL 2003). É considerada como uma cultura de alto risco no país, pois a sua implantação se baseia principalmente no uso de sementes importadas, que onera significativamente o seu custo de produção e obriga o produtor a utilizar cultivares de batata que nem sempre estão adaptadas ao nosso clima, não tendo, portanto, a mesma produtividade que no país de origem. Além disso, a ocorrência de pragas e doenças, dentre as quais as de etiologia virótica que ocupam lugar de destaque, é grandemente favorecida pelas condições climáticas do Brasil, podendo ocasionar a degenerescência das sementes após poucas multiplicações em campo, obrigando o produtor a recorrer a novas importações (Cupertino & Costa, 1970; Souza Dias et al., 1983; 1985; Figueira et al., 1985; 1996; Beemster; De Bokx, 1987; Weideman, 1988).

O vírus X da batata (*Potato virus X* - PVX) nunca esteve associado a grandes perdas na cultura no Brasil, principalmente porque as sementes importadas ou estavam isentas ou apresentavam um índice muito baixo desse vírus (Daniels, 1995; Figueira, 1995; Hirano, 1995; Lima, 1995; Souza Dias, 1995). Entretanto, com a recente abertura do mercado brasileiro aos países integrantes do Mercosul, que permitem a comercialização de sementes com alta incidência desse vírus, o PVX passou a ser tratado como praga não quarentenária regulamentada, podendo estar presente nas sementes básicas em índices não superiores a 1% (MAPA, 2001).

O PVX encontra-se disseminado no mundo inteiro e pode causar a diminuição do número e do tamanho dos tubérculos, induzindo perdas em torno de 10% na produção. Se associado, porém, ao PVY, o PVX pode induzir

sintomas mais severos e provocar perdas acima de 50% na produção (Mizubuti, 1981; Hooker, 1981; Beemster; De Bokx, 1987). Isso justifica os baixos índices de incidência de PVX previstos pela legislação que estabelece as normas para produção e comercialização de batata-semente no Brasil, em que a ocorrência do vírus Y (*Potato Virus Y* – PVY) tem aumentado nos últimos anos (Figueira & Pinto, 1995; Souza Dias et al., 1995, Figueira et al., 1996).

O PVX tem uma gama de hospedeiras restrita nas famílias Solanaceae e algumas espécies de Amaranthaceae e Chenopodiaceae. Não é transmitido por vetor, no entanto é facilmente transmitido por meios mecânicos e por enxertia, podendo ser rapidamente disseminado numa cultura, após a sua introdução através das sementes. Muitas estirpes de PVX são conhecidas e apresentam grande variabilidade patogênica. A classificação das estirpes se dá por meio de testes biológicos, sorológicos e ou moleculares e podem ser catalogadas, segundo Cockerham (1970), em quatro grupos, de acordo com a sua virulência aos genes de hipersensibilidade Nx e Nb. O gene Nb confere resistência contra as estirpes dos grupos 1 e 2, enquanto que o gene Nx confere resistência contra as estirpes dos grupos 1 e 3. Ambos os genes, Nx e Nb, não conferem resistência ao grupo 4.

As estirpes do grupo 1 se caracterizam por induzirem anéis verde-claros na superfície das folhas de fumo (*Nicotiana tabacum*), seguidos por um mosqueamento verde-escuro e verde-claro. Essas estirpes ocorrem principalmente associadas às estirpes do grupo 3. As do grupo 2 são encontradas apenas ocasionalmente, sendo que essas podem ter seus sintomas modificados em experimentos de enxertia. O grupo 3 compreende as estirpes que ocorrem mais frequentemente. Elas causam mosqueamento claro nas folhas de fumo e, em genótipos de batata portadores do gene Nx, induzem lesões pretas nas folhas após a infecção das células. Finalmente as do grupo 4 não ativam os genes N, podendo infectar cultivares com genes Nx e Nb, mas não aquelas com o alelo Rx (Ross, 1986).

O alelo Rx é encontrado em plantas que apresentam alta resistência ao PVX, e foi primeiramente descrito por (Shultz et. al. 1933 e 1934), citados por Querci et. al., (1995). Ele controla um tipo de resistência completa, também denominada imunidade, sendo predominantemente monogênica, dominante, altamente herdável e considerada durável, pois não ocorre alteração da proteção imune por ação de fatores climáticos como se observa nos outros tipos de resistência (Brandolini et al., 1992).

No Brasil, os programas de melhoramento genético estão se empenhando em desenvolver cultivares de batata brasileiras, que apresentem melhores condições de adaptabilidade ao clima tropical e resistência a diversos vírus, incluindo o PVX (Silva et al., 2000). Entretanto a maior dificuldade encontrada nesses programas está ligada ao completo desconhecimento das estirpes que ocorrem no Brasil. O fato de sua incidência, nos campos brasileiros de produção de batata, ser muito baixa faz com que não sejam enquadrados em nenhum programa de investigação e pesquisa. Isso dificulta a realização dos testes de resistência ao PVX, nos clones em estudo, pois uma vez que a reação da planta depende da estirpe do vírus, que está sendo testada, torna-se complicado classificar o tipo de resistência com o qual se está trabalhando.

Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivo coletar isolados de PVX, provenientes dos principais estados produtores de batata no Brasil (Minas Gerais, São Paulo, Santa Catarina, Rio Grande do Sul e Distrito Federal), a fim de caracterizá-los por meio de estudos biológicos, utilizando hospedeiras experimentais e teste sorológico DAS-ELISA. Foram feitas também avaliações da produtividade e da suscetibilidade dos clones de batata (OAS), supostamente resistentes, provenientes da coleção de melhoramento de batata da UFLA, aos isolados estudados, para selecionar os considerados promissores para serem empregados na obtenção de cultivares brasileiras de batata resistentes ao PVX.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados sob condições de casa-de-vegetação e no laboratório de Virologia Vegetal do Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Lavras (DFP/UFLA).

2.1 Origem e manutenção dos isolados

Os isolados de PVX foram obtidos a partir de brotos de tubérculos de batata infectados, provenientes das regiões de Nova Resende, Lavras, Santa Juliana, Uberlândia e Itapetininga recebidos para a análise no Centro de Indexação de Vírus Minas Gerais (IMA/UFLA) e outros isolados foram gentilmente cedidos por pesquisadores de Canoinhas - SC, Pelotas - RS, Brasília - DF e Viçosa - MG (Tabela 1).

TABELA 1. Nomenclatura e origem dos isolados de PVX estudados. UFLA, Lavras - MG, 2003.

Vírus (Isolado)	Espécie hospedeira	Origem
BR	Batata cv. Monalisa	Brasília - DFF
CAN	Batata cv. Achat	Canoinhas - SC
LAV	Batata cv. Monalisa	Lavras - MG
NR	Batata cv. Baraka	Nova Resende - MG
SJ	Batata cv. Monalisa	Santa Juliana -MG
P21	Batata cv. Monalisa	Pelotas - RS
P22	Batata cv. Monalisa	Pelotas - RS
UDI	Batata cv. Monalisa	Uberlândia - MG
UF	Batata cv. Monalisa	Lavras - MG
VEL	Batata cv. Velox	Itapetininga -SP
VIC	Fumo 'TNN'	Viçosa - MG

Todas as plantas utilizadas nesse ensaio foram obtidas por meio de semeadura em bandejas de isopor, sendo transplantadas posteriormente, ao

atingir o tamanho ideal, para vasos com capacidade de 2 Kg, contendo, como substrato, terra, areia e esterco fumigados, na proporção 3:1:1, em condições de casa-de-vegetação.

A manutenção e multiplicação dos isolados virais "in vitro" foi realizada por inoculação mecânica utilizando-se extratos de plantas infectadas, por meio de trituração em almofariz esterilizado, na proporção de 1:5 (p/v) em tampão fosfato 0,01M, pH 7, contendo sulfito de sódio na mesma molaridade. Este extrato foi friccionado com algodão umedecido, nas folhas de *Gomphrena globosa* e *Nicotiana tabacum*, cultivar "TNN" previamente polvilhadas com carborundum (500 a 600 mesh), com as mãos protegidas por saco plástico e posteriormente as folhas inoculadas foram lavadas e mantidas em casa-de-vegetação. Folhas de fumo infectadas por esses isolados foram dessecadas e estocadas a -20°C e a -80°C .

2.2 Reação de diferentes hospedeiras aos isolados estudados

Os isolados de PVX estudados foram inoculados mecanicamente, conforme descrito acima, nas seguintes plantas silvestres e cultivadas: *Alternanthera tenella*, *Bidens pilosa*, *D. stramonium*, *Capsicum annuum* "Agrônômico 10G", *Chenopodium quinoa*, *C. amaranticolor*, *Gomphrena globosa*, *Helianthus annuus*, *Lycopersicon esculentus* cv. Santa Rosa, *Physalis floridana*, *Nicandra physaloides*, *Nicotiana tabacum* (TNN), *Nicotiana benthamiana*, *N. glutinosa*, *N. havana*, *N. glauca* e *Phaseolus vulgaris*. Após a inoculação as plantas foram mantidas em casa-de-vegetação por aproximadamente 40 dias até a fase final de observação. As espécies que não apresentaram sintomas, 3 a 4 semanas após a inoculação, foram submetidas ao teste de detecção de vírus por inoculação em *G.*

globosa e pelo teste DAS-ELISA. Esse procedimento foi adotado nas duas épocas de avaliações dos experimentos: setembro de 2001 e Julho de 2002.

2.3 Teste Sorológico DAS-ELISA

Para diagnose por meio do teste sorológico DAS-ELISA, foram utilizados antissoros comerciais para o PVX (Bioreba). Os tampões para realização do teste foram preparados no Centro de Indexação de Vírus de Minas Gerais. Foram utilizados o tampão de cobertura (carbonato-bicarbonato 0,025M, pH 9,6), tampão para extração da amostra (PBS pH 7,4 contendo 0,05% de Tween - 20), tampão do conjugado (PBS contendo 0,1% de leite em pó desnatado e 0,1% de Tween - 20), tampão do substrato (dietanolamina pH 9,8) e tampão de lavagem (PBS contendo 0,05% de Tween - 20). As diluições dos antissoros seguiram as instruções do fabricante. Foram utilizadas microplacas padrões, com 96 orifícios. Os testes seguiram as seguintes etapas:

1 - Cobertura inicial das placas: 50µl/orifício dos antissoros para PVX (policlonal) diluído em 1:1000. Incubação por 2h a 37°C;

2 - Lavagem: 4-5 vezes com água deionizada e 2 vezes com tampão de lavagem (idêntica em todos os passos).

3 - Adição do antígeno: 50µl/orifício do extrato de tecidos de plantas e/ou tubérculos infectados, diluído 1:10 ou 1:5 (p/v) em PBS seguindo a distribuição na placa de acordo com o protocolo elaborado. Incubação a 4°C de um dia para o outro, seguida de nova lavagem.

4 - Adição do conjugado: 50µl/orifício de anticorpo (para PVX) conjugado com a enzima fosfatase alcalina, diluído em 1:1000. Incubação por 2-3h a 37°C (policlonal) e lavagem.

5 - Adição do substrato: 50µl/orifício de p-nitrofenilfosfato (1mg/ml), incubação à temperatura ambiente por 1-2 horas e leitura a 405nm no aparelho MRX (Dynatech).

Foram consideradas positivas as amostras cujas absorvâncias foram maiores ou iguais a duas vezes a média de absorvância do controle, compreendido pelo suco da planta sadia.

2.4 Avaliação da reação dos clones de batata OAS aos isolados de PVX

Os 48 clones de batata (denominados OAS pelo Programa de Melhoramento de Batata da UFLA), avaliados nesse trabalho, foram obtidos por Silva et al., (2000) e são resultantes dos cruzamentos biparentais realizados pelo programa de melhoramento de batata da UFLA entre materiais imunes ao vírus X e Y, na condição simplex.

2.4.1 Avaliação dos clones de batata

O ensaio de casa-de-vegetação foi conduzido nos meses de junho e julho, quando as temperaturas máximas foram de 29°C, para ambos os meses e as mínimas de 26,4°C e 25,6°C, respectivamente. As médias das médias foram 18,7°C e 17,7°C, respectivamente. (UFLA, 2002).

Os clones de batata OAS foram submetidos a duas avaliações distintas para checar a sua reação ao PVX em casa-de-vegetação e outra para verificar a sua produção em condição de campo.

A reação desses 48 clones aos 11 isolados de PVX foi investigada por meio da enxertia dos clones em plantas de fumo infectadas, no estágio da folha coledonar, com os isolados estudados. Para cada um dos 11 isolados testados, foram utilizadas 102 plantas de fumo cv. " TNN ", para servirem como porta-enxerto, sendo 2 para cada um dos 48 clones OAS, e 2 para cada uma das cultivares Baraka, Achat e Monalisa, que foram utilizadas como testemunha. Em primeiro lugar as plantas de fumo foram inoculadas mecanicamente com os 11 isolados de PVX e observadas até o aparecimento dos sintomas típicos da virose, compreendidos por mosaico e anéis cloróticos. Então o topo das plantas de fumo

foi eliminado, a quinze centímetros do solo, com uma lâmina de bisturi e os clones e demais plantas testemunhas de batata foram cortadas na base da haste do ponteiro e enxertadas por garfagem no topo das plantas de fumo infectadas. Essas plantas foram individualmente etiquetadas e mantidas em casa-de-vegetação até a avaliação final do experimento. Cuidado especial foi tomado para não haver a contaminação das plantas com outro isolado, utilizando-se luvas e lâminas de bisturi descartáveis. Foram enxertadas duas hastes de cada clone, em duas épocas distintas. Quinze a vinte dias após a enxertia, avaliou-se a reação dos clones por meio do teste sorológico DAS-ELISA. Nos clones com reação negativa ao DAS-ELISA, aos vinte dias, procedeu-se à tentativa de recuperação dos isolados de PVX, através de inoculação mecânica em plantas de fumo (*Nicotiana tabacum* "TNN ") e nova aplicação do teste DAS-ELISA aos 30 dias após a enxertia. Esse procedimento foi realizado com o objetivo de comprovar se não teriam ocorrido escapes, nos clones selecionados como resistência extrema.

Para avaliação da produção, foi conduzido um ensaio entre o período de junho a setembro de 2001, na área experimental do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras, em solo classificado como latossolo vermelho escuro distrófico, textura argilosa e relevo suavemente ondulado.

Empregou-se o delineamento látice simples 8x8. A parcela experimental foi constituída de três plantas espaçadas de 0,35 m e entre linhas de 0,75 m. Como testemunha foi empregada a cultivar Monalisa. No plantio, foi feita uma adubação com a formulação 4-14-8 (N, P₂O₅ e K₂O) na dosagem de 3,0 t/ha e inseticida de solo (aldicarb) na dosagem de 10 Kg/ha. Por volta dos 40 dias após o plantio, realizou-se a adubação nitrogenada em cobertura com 300 Kg/ha de sulfato de amônio e 160 Kg/ha de cloreto de potássio, seguida da operação de amontoa. Os tratos fitossanitários foram realizados durante a condução dos experimentos, visando mantê-los sem a competição de plantas invasoras e danos de pragas e doenças.

Avaliaram-se os seguintes caracteres:

- produção por planta (em g);
- porcentagem de tubérculos graúdos—diâmetro transversal acima de 45 mm;
- peso específico dos tubérculos, obtido pela fórmula:

$$D = \frac{\textit{peso ar}}{\textit{peso ar} - \textit{peso água}}$$

Os pesos no ar e na água foram determinados em balanças hidrostática.

Nesse ensaio dos clones foi adotado o seguinte modelo estatístico:

$$Y_{ijk} = \mu + r_j + t_i + b_{kj} + e_{ijk}$$

Y_{ijk} : valor observado na parcela que recebeu o tratamento i no bloco k dentro da repetição j ;

μ : média geral;

r_j : efeito da repetição j , $j = 1, 2, 3$;

t_i : efeito do tratamento, $i = 1, 2, \dots, 64$;

b_{kj} : efeito do bloco k dentro da repetição j , $k = 1, 2, \dots, 8$;

e_{ijk} : erro experimental, $e_{ij} \cap \text{NID}(0, \sigma^2)$

Foi realizado o teste de comparação das médias com as testemunhas, pelo programa SAS para todas as características avaliadas.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Sintomatologia em plantas indicadoras inoculadas com os isolados de PVX

Os resultados da inoculação mecânica encontram-se discriminados nas tabelas 2 e 3. Conforme o esperado, encontraram-se diferenças entre os sintomas induzidos pelos isolados em algumas espécies hospedeiras, nas duas épocas de

realização do teste, confirmando a alta influência dos fatores ambientais, tais como a temperatura, na manifestação dos sintomas induzidos pelo PVX. Segundo Munro (1981) e Mizubuti (1981) os sintomas de PVX em muitas espécies de plantas são favorecidos por temperaturas mais amenas entre 16°C a 20 °C e podem ser mascarados em temperaturas acima de 28 °C.

No ensaio setembro de 2001, a espécie de tomateiro (*Lycopersicum esculentum* cv. Santa Clara) apresentou mosaico e rendilhamento (Figura 1a), quando inoculada com os isolados LAV e NR (Tabela 2) e mosaico médio quando esta foi inoculada com os isolados restantes (Figura 1b). Porém, no ensaio de julho de 2002, essas duas hospedeiras apresentaram apenas sintomas de mosaico (Tabela 3). Esses resultados corroboram os de Singh (1969) que, trabalhando com a espécie *Datura metel*, verificou que a temperatura teve um pronunciado efeito na expressão de diferentes sintomas. As inoculações de PVX em temperatura de 13 °C resultaram em sintomas de lesão local ao passo que a 24°C esses foram de mosaico sistêmico. No girassol (*Helianthus annuus*) todos os isolados causaram pontos cloróticos locais e mosaico leve ou médio aos 20 dias, após a inoculação, evoluindo para queima das folhas mais velhas após os 30 dias de inoculação. Entretanto os sintomas induzidos pelo isolado VEL foram mais severos (Figura 2a e 2b).

TABELA 2. Sintomas apresentados pelas diversas espécies de plantas inoculadas mecanicamente com os onze isolados do Vírus X da Batata (PVX), em setembro/2001.Lavras - MG, 2003.

Espécies de plantas Inoculadas	Sintomas induzidos pelos Isolados de PVX em cada uma das hospedeiras inoculadas										
	BR	CAN	LAV	NR	P21	P22	SJ	UDI	UF	VEL	VIC
<i>Capsicum annuum</i>	MMS	ML	MM	MM	ML,	MM	MM	MM	MM	MM	MM, PNL
<i>Crenopodium amaranticolor</i>	PCL, PCS	PCL, PCS	PCL, PCS	PCL, PCS	PCL, PCS	PCL, PCS	PCL, PCS	PCL, PCS	PCL, PCS	PCL, PCS	PCL, PCS
<i>Chenopodium quinoa</i>	PCL, PCS	PCL, PCS	PCL, PCS	PCL, PCS	PCL, PCS	PCL, PCS	PCL, PCS	PCL, PCS	PCL, PCS	PCL, PCS	PCL, PCS
<i>Datura stramonium</i>	MM,	MM	MM	MM	MM,	MM	MM	MM,	MM,	MM	MM
<i>Gomphrena globosa</i>	PNL, AV	PNL, AV	PNL, AV	PNL, AV	PNL AV	PNL, AV	PNL, AV	PNL, AV	PNL, AV	PNL, AV	PNL, AV
<i>L. esculentum</i>	MM	ML	MM, R	MM, R	ML	ML	ML	MM	MM	MM	MM
<i>Nicandra physaloides</i>	MS	MM	MM	ML	MM	MM	MM	MM	MM	MM	MM
<i>Nicotiana benthamiana</i>	MM, CCN	MM, CCN	MM, CCN	ML, CCN	MM	MM	MM	MM	MM	MM, CCN	MM, CCN
<i>N. glutinosa</i>	MM	ML	ML	MM	MM	MM	MM	ML	MM	MS	ML
<i>N. havana</i>	MM	ML	ML	MM	MM, PNL	MM, PNL	MM, PNL	MM, PNL	MM, PNL	MM	ML
<i>N. tabacum</i> FNN	MM, AC	ML	ML, AC	ML	MM	MM	MM	MM	MM, AC	MM	MM, AC
<i>Physalis floridana</i>	MM	ML	MM	MM,	SS	MM	MM	ML	MM	MM	MM
<i>Phaseolus vulgaris</i>	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS

AC = Anéis cloróticos, AV = Anéis vermelhos, CCN = Clareamento central de nervuras, DF = Deformação foliar, ML = Mosaico; leve, MM = Mosaico médio, MS= Mosaico severo, PCL= Pontos cloróticos locais, PCS= Pontos cloróticos sistêmicos, PNL: Pontos necróticos locais, R = Rendilhamento, SS= Sem Sintomas.

TABELA 3. Sintomas apresentados pelas diversas espécies de plantas inoculadas mecanicamente com os onze isolados do Vírus X da Batata (PVX), em julho/2002. Lavras - MG, 2003.

Espécies de plantas inoculadas	Sintomas induzidos pelos Isolados de PVX em cada uma das hospedeiras inoculadas										
	BR	CAN	LAV	NR	P21	P22	SJ	UDI	UF	VEL	VIC
<i>Alternanthera tenella</i>	PCL	PCL	PCL	PCL	PCL	PCL	PCL	PCL	PCL	PCL	PCL
<i>Bidens Pilosa</i>	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS
<i>Capsicum annuum</i>	MM, PNL	MM, PNL	MM, PNL	MM, PNL	ML, PNL	MM, PNL	MM, PNL	MM, PNL	MM, PNL	MS, PNL	MM, PNL
<i>Chenopodium quinoa</i>	PCL, PCS	PCL, PCS	PCL, PCS	PCL, PCS	PCL, PCS	PCL, PCS	PCL, PCS	PCL, PCS	PCL, PCS	PCL, PCS	PCL, PCS
<i>C. amaranticolor</i>	PCL, PCS	PCL, PCS	PCL, PCS	PCL, PCS	PCL, PCS	PCL, PCS	PCL, PCS	PCL, PCS	PCL, PCS	PCL, PCS	PCL, PCS
<i>Datura stramonium</i>	MM,	MM	MM	Ms	MM	MM	MS	MM	MS	MS, DF	MM
<i>Gomphrena globosa</i>	PNL, AV	PNL, AV	PNL, AV	PNL, AV	PNL, AV	PNL, AV	PNL, AV	PNL, AV	PNL, AV	PNL, AV	PNL, AV
<i>Helianthus annus</i>	ML, QF	ML, QF	ML, QF	ML, QF	ML, QF	ML, QF	ML, QF	ML, QF	ML, QF	ML, QF	ML, QF
<i>Lycopersicum . esculentum</i>	MM	MM	MM	MM	MM	MM	MM	MM	MM	MS	MM
<i>Nicotiana benthamiana</i>	MS, CCN	MM, CCN	MM, CCN	MM, CCN	ML, CCN	ML, CCN	MM, CCN	MM, CCN	MM, CCN	MS, CCN	MM, CCN
<i>Nicotiana glauca</i>	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS
<i>N. glutinosa</i>	MM	ML	ML	MM	MM	MM	MM	ML	ML	MS	ML
<i>N. havana</i>	MS	MM	MM	ML	MM	MM	MM	MM	MM	MS	MM
<i>N. rustica</i>	AC, MM	AC, MM	AC, MM	AC, MM	MS, AC	MM	AC, MM	AC	AC, ML	AC, MM	AC, MM
<i>N. tabacum 'TNN'</i>	MS, AC	ML, AC	MM, AC	MM, AC	MM, AC	MM, AC	MS, AC	MS, AC	MS, AC	MS, AC	MM, AC
<i>Physalis floridana</i>	MM	ML	MM	MM	SS	ML	MM	MM	MM	MS	MM

AC= Anéis cloróticos, AV=Anéis vermelhos, CCN= Clareamento central de nervuras, QF= Queda foliar, ML= Mosaico leve, MM= Mosaico médio, MS= Mosaico severo, PCL= Pontos cloróticos locais, PCS= Pontos cloróticos sistêmicos, PNL= Pontos necróticos locais, R = Rendilhamento, SS= Sem Sintomas.



FIGURA 1. Folhas de tomateiro, cv. Santa Clara, infectadas com PVX: a- com os isolados LAV e NR, apresentando sintomas de mosaico cloro rendilhamento; b- com os demais isolados em estudo, apresentando sintomas de mosaico.

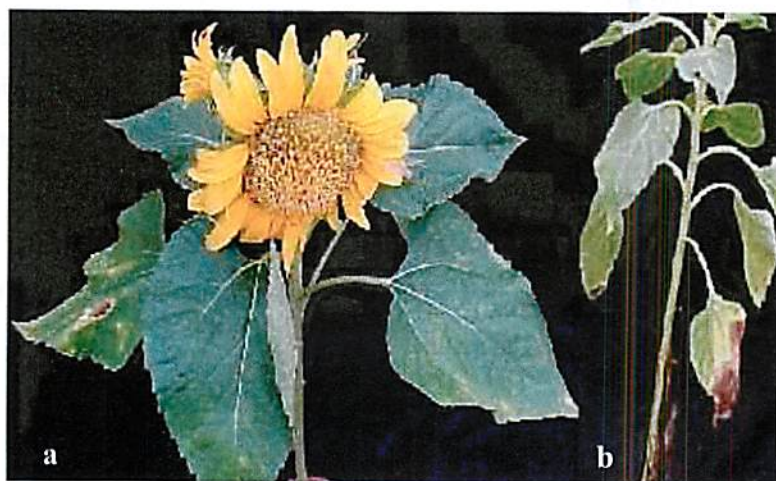


FIGURA 2. Plantas de girassol, infectadas com PVX, apresentando: a - mosaico, e pontos cloróticos sistêmicos aos 20 dias após a inoculação; b - queima das folhas, aos 30 dias após a inoculação.

Os resultados obtidos nesse trabalho coincidem com os de Querci et al., (1995), que observaram sintomas de pontos cloróticos locais e mosaico leve, quando inocularam girassol com as estirpes de PVX (CP4 e CP4-KR). Nas espécies de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*) (Tabela 2), picão preto (*Bidens pilosa*) e *Nicotiana glauca* (Tabela 3) observou-se que todos os isolados testados não induziram sintomas, em nenhuma das duas épocas de avaliação. Quando se tentou fazer a recuperação do vírus a partir dessas plantas, por inoculação mecânica em plantas de *Gomphrena globosa* e de fumo (*Nicotiana tabacum* 'TNN'), verificou-se que o resultado foi negativo, que também aconteceu quando as plantas foram testadas por DAS –ELISA.

Todos os isolados em estudo produziram sintomas de lesões locais cloróticas e necróticas, nas espécies de *Chenopodium amaranticolor* e *C. quinoa*, pontos necróticos e halo avermelhado na indicadora *G. globosa* e mosaico em *Nicotiana havana*. Esses sintomas são semelhantes aos encontrados por Talens (1979) e Querci et al., (1995). A espécie *Physalis floridana* reagiu com sintoma de mosaico médio a todos os isolados de PVX inoculados (Tabelas 2 e 3), exceto para o isolado do Rio Grande do Sul (P21), que não induziu sintomas. Não foi possível a recuperação desse isolado a partir de *P. floridana*, por inoculação em *G. globosa* e fumo 'TNN' e o teste DAS-ELISA foi negativo.

Na espécie *N. glutinosa*, o isolado VEL induziu sintomas de mosaico severo (Figura 3a), enquanto que os demais isolados induziram sintomas mais atenuados, nas duas épocas de avaliações (Figura 3b).

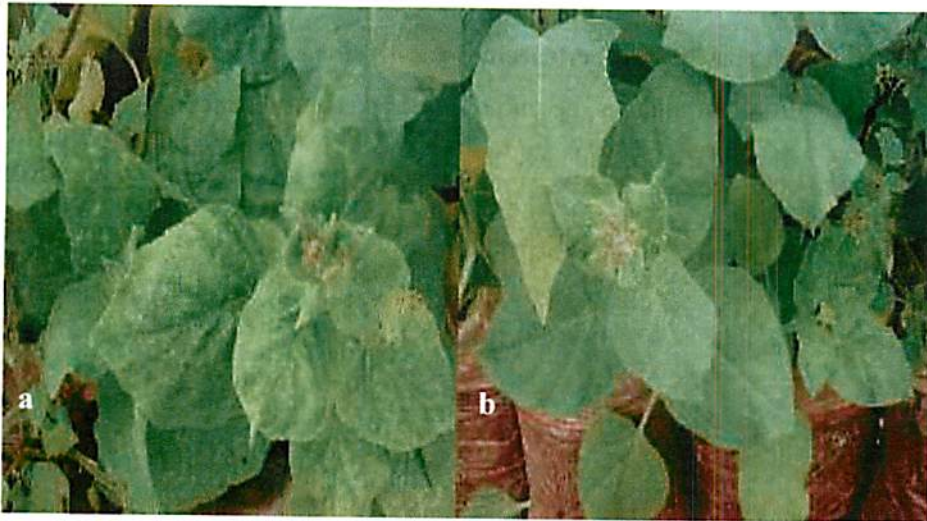


FIGURA 3. Plantas de *Nicotiana glutinosa*, infectadas com o PVX, apresentando: a- mosaico severo quando infectadas com o isolado VEL; b - mosaico médio quando infectada com os demais isolados em estudo.

Devido à suscetibilidade e à diferença de reação apresentada para cada isolado, as espécies *N. glutinosa* e *P. floridana* podem ser consideradas como excelentes diferenciadoras, capazes de discriminar entre os isolados PVX VEL e P21.

3.2 Análise dos clones OAS em casa-de-vegetação

3.2.1 Triagem dos clones ao PVX

O efeito da inoculação dos onze isolados de PVX, em estudo, nos 48 clones testados nesse trabalho (Tabela 4) foi bastante distinto. Como se pode verificar, houve uma interação diferenciada entre os clones e a maioria dos isolados do PVX, de modo que algumas plantas se mostraram suscetíveis a um isolado e resistentes a outro. A própria cultivar Baraka, que é tida como resistente ao PVX, mostrou-se suscetível aos isolados VEL, NR, LAV, UDI, BR, CAN e P22. Da mesma forma pode ser

TABELA 4. Reação das plantas pertencentes aos 48 clones de batata testados, por enxertia em plantas de fumo infectadas com cada um dos onze isolados de PVX estudados.

Clone	BR	CAN	LAV	NR	P21	P22	SJ	UDI	UF	VEL	VIC
Achat	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Monalisa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
OAS 4,67	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
OAS 1,121	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+
OAS 2,89	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+
Baraka	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-
OAS 4,47	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-
OAS 4,25	-	-	+	+	-	-	+	+	-	+	-
OAS 3,34	+	-	+	-	-	-	+	+	-	-	+
OAS 1,44	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-	+
OAS 2,108	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	+
OAS 4,30	-	+	-	-	+	+	-	-	-	+	-
OAS 6,67	+	-	+	-	-	+	+	-	+	+	-
OAS 3,45	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-
OAS 4,45	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-
OAS 6,38	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-
OAS 1,56	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-
OAS 2,35	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+
OAS 3,50	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-
OAS 4,24	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-
OAS2,74	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-
OAS 2,103	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-
OAS 1,69	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-
OAS 1,41	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-
OAS 1,64	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+
OAS 4,80	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
OAS 3,62	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
OAS 3,80	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-
OAS 1,15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
OAS 3,27	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
OAS 2,22	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
OAS 1,66	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
OAS 1,21	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
OAS 1,61	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
OAS 1,28	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

“...Continua...”

TABELA 4. "Cont."

OAS 2,65	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
OAS 2,116	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
OAS 2,111	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
OAS 2,88	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
OAS 4,40	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
OAS 3,54	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
OAS 3,55	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
OAS 3,30	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
OAS 4,46	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
OAS 5,12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
OAS 3,46	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
OAS 3,48	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
OAS 5,19	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
OAS 6,27	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
OAS 7,25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

+, - reação positiva ou negativa, respectivamente, ao PVX, diagnosticadas pelo teste DAS-ELISA.

que o isolado de PVX empregado para testar originalmente os clones, considerados resistentes, não tenha conseguido se multiplicar na planta para atingir concentrações detectáveis, pois sabe-se que na verdade o gene Rx não confere imunidade, podendo ser observado, sob certas condições, um baixo nível de acúmulo de PVX em plantas portadoras do gene Rx (Benson & Hooker, (1960) citados por Köhm et al., (1993).

Por outro lado esses clones podem não possuir o gene Rx, que confere resistência ao PVX. Para verificar se esses clones realmente possuem o gene Rx, que confere resistência extrema a todas as estirpes de PVX, exceto ao PVX_{HB}, da Bolívia, seria necessário o uso de marcadores moleculares. Para isso, atualmente está sendo conduzido um trabalho paralelo, pelos pesquisadores envolvidos no programa de Melhoramento de batata da UFLA, usando marcadores moleculares para a detecção do gene Rx.

Os resultados obtidos mostram a importância de se conhecer o isolado empregado para comprovar a resistência ao PVX nos clones empregados em

programas de melhoramento genético. Pode-se observar pelos resultados discriminados na tabela 4, que nenhum dos isolados testados foi capaz de detectar os 27 clones considerados suscetíveis pela técnica empregada. O mais agressivo e eficiente foi o VEL, que infectou 19 (67%) dos que apresentaram reação positiva ao PVX por DAS-ELISA, seguido pelos isolados P21, P22 e LAV que infectaram mais de 40% dos clones suscetíveis.

Considerando-se os 27 clones suscetíveis, pôde-se também verificar que a maioria deles poderia ter sido detectada se fossem utilizados apenas dois isolados: VEL e P21. Aqueles clones que apresentaram reação negativa para esses dois isolados, que foram menos de 15% (4 em 27) neste trabalho, poderiam ter sido detectados pelo isolado VIC, o qual foi capaz de infectar essas plantas ELISA negativas para o VEL e o P21. Desse modo será possível, utilizando os isolados aqui testados e selecionados, realizar uma triagem mais rápida e eficiente dos futuros clones a serem utilizados no programa de melhoramento de batata da UFLA, pois esse método de triagem, empregando enxertia (Figura 4 a e 4b) e DAS-ELISA, revelou-se fácil e sensível para essa finalidade.

Os 21 clones OAS que foram testados por enxertia, em plantas de fumo infectadas e apresentaram ELISA negativo para todos os isolados virais utilizados, não tiveram o PVX recuperado quando o extrato dos seus tecidos foi inoculado em plantas de fumo (*N. tabacum* TNN⁷) e *G. globosa*. Esses clones têm uma grande possibilidade de realmente possuírem o alelo Rx, constituindo assim um material promissor como fonte de resistência para o PVX. Isso deve ser confirmado pelos testes adicionais utilizando marcadores moleculares, que estão sendo realizados pelos pesquisadores do programa de melhoramento em batata da UFLA.

Esses clones OAS já haviam sido testados por inoculação mecânica em experimentos anteriores, utilizando-se um isolado de PVX não identificado, tendo 98% deles se comportado como resistentes em duas inoculações consecutivas

realizadas por Silva et al., (2000). Esses resultados se assemelham

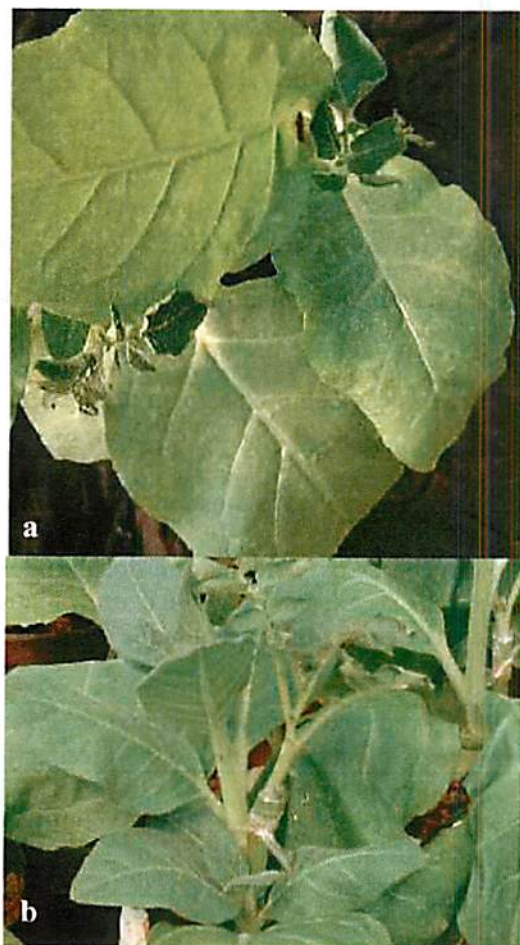


FIGURA 4 Sintomas de mosaico e anéis cloróticos induzidos por PVX em fumo *Nicotiana tabacum* “TNN”, enxertados com clone OAS.

aos de Vallejo et al. (1994) que, estudando a forma de resistência extrema aos vírus X e Y em híbridos de *Solanum phureja* e *S. stenotomum*, verificaram que, após uma pré-seleção ao vírus X e Y de 554 clones avaliados, apenas 224 apresentaram resistência. Estes clones foram então inoculados duas vezes com PVX (estirpe

comum) e avaliados visualmente e por teste sorológico ELISA. Os clones que deram reação negativa foram re-inoculados em plantas de *G. globosa*. Após esse processo, os autores conseguiram apenas sete clones com resistência extrema e a frequência de resistência extrema foi de 1,3%.

3.3 Avaliação da Produção

Na Tabela 5 pode-se verificar a produção dos 48 clones OAS avaliados para resistência ao PVX, em um plantio realizado no período de julho a setembro/2002, em Lavras – MG. Dentre os clones avaliados, 10 se destacaram apresentando produção acima de 600 gramas/planta. Entretanto, apenas a metade deles (OAS 1,121; OAS 2,88; OAS 3,27; OAS 3,30 e OAS 4,67) foram resistentes ao PVX, conforme resultados mostrados anteriormente.

Tabela 5 – Produção de tubérculos, porcentagem dos grãos, peso específico e teor de matéria seca para os vinte e um clones imunes aos onze isolados de PVX e testemunha avaliados em Lavras, MG.

Clone	Produção por planta	% Grãos	Peso específico	Teor de Matéria seca
OAS 1,121*	649	81	1.078	21,25
OAS 1,15*	508	38	1.078	21,25
OAS 1,21*	442	56	1.081	21,92
OAS 1,28*	581	62	1.072	19,92
OAS 1,41	913	73	1.063	17,93
OAS 1,56	616	67	1.079	21,47
OAS 1,61*	397	54	1.076	20,81
OAS 1,64	508	77	1.075	20,59
OAS 1,66*	572	62	1.072	19,93
OAS 1,69	400	54	1.069	19,26
OAS 2,103	567	80	1.085	22,80
OAS 2,108	748	83	1.085	22,80
OAS 2,111*	338	61	1.068	19,04

“...Continua...”

TABELA 6. “ Cont.”

OAS 2,116*	345	64	1.078	21,25
OAS 2,22*	517	60	1.076	20,81
OAS 2,35	706	80	1.076	20,81
OAS 2,65*	529	63	1.074	20,36
OAS 2,74	705	84	1.081	21,92
OAS 2,88*	708	61	1.080	21,69
OAS 2,89	568	58	1.081	21,92
OAS 3,27*	680	66	1.072	19,92
OAS 3,30*	683	76	1.073	19,93
OAS 3,34	460	79	1.068	19,04
OAS 3,45	463	76	1.079	21,47
OAS 3,46*	382	71	1.066	18,59
OAS 3,48*	384	64	1.078	21,25
OAS 3,50	942	85	1.077	21,03
OAS 3,54*	470	61	1.077	21,03
OAS 3,55*	565	79	1.079	21,47
OAS 3,62	150	35	1.088	23,46
OAS 3,80	306	57	1.058	16,83
OAS 4,24	445	88	1.072	19,93
OAS 4,25	584	69	1.076	20,81
OAS 4,30	410	51	1.074	20,36
OAS 4,40*	554	66	1.077	21,03
OAS 4,45	457	51	1,053	15,72
OAS 4,46*	492	65	1.088	23,46
OAS 4,47	539	62	1.071	19,70
OAS 4,67	708	74	1.077	21,04
OAS 4,80	436	70	1.075	20,59
OAS 5,12*	391	77	1.074	20,36
OAS 5,19*	651	86	1.077	21,03
OAS 6,27*	408	54	1.066	18,59
OAS 6,38	500	83	1.056	16,38
OAS 6,67	468	69	1.078	21,25
OAS 7,25*	364	65	1.073	20,14
Monalisa	686	59	1.070	19,48

* imunes aos onze isolados de PVX

Outros sete clones também foram resistentes ao PVX e apresentaram uma produtividade igualmente boa, acima de 500g/planta: OAS 1,15; OAS 1,28; OAS 1,66; OAS 2,22; OAS 2,65; OAS 3,55 e OAS 4,40.

Outras características consideradas relevantes, que também foram avaliadas são a porcentagem de tubérculos graúdos e o peso específico de tubérculos. É considerado ótimo um mínimo de 60% de tubérculos com diâmetro igual ou maior a 45 mm e teor de matéria seca de aproximadamente 20% (Barbosa, 1996). Todas os 12 clones que apresentaram resistência ao PVX e produção acima de 500g/planta também apresentaram uma proporção acima de 60% de tubérculos iguais ou maiores que 45mm e teor de matéria seca dos tubérculos superiores a 18%, sendo considerados materiais ideais para atenderem as indústrias de fritas (Barbosa, 1996). Portanto, se forem consideradas a resistência ao PVX e as características de produção, esses 12 clones podem ser considerados como material de alto interesse para o programa de melhoramento de batata da UFLA.

Na Tabela 6, pode-se verificar diferenças significativas entre os clones para os caracteres produção comercial de tubérculos por planta, porcentagem de tubérculos graúdos e densidade dos tubérculos, evidenciando grande variabilidade genética entre clones. Os coeficientes de variação (CV%) para os caracteres avaliados foram relativamente altos, embora estejam de acordo com os padrões normalmente encontrados para a cultura da batata (Vermmer, 1990).

Tabela 6 Resumo das análises de variância para a produção de tubérculos, porcentagem de tubérculos graúdos e peso específico de tubérculos para clones avaliados em Lavras –MG.

FV	GL	QM		
		Produção	% Tub. Graúdo	Peso específico
Repetições	2	49951.781	63.318	20677.047
Trat. ajustados	63	6352186.794**	863.504**	14431.930**
Bl/repetições	21	1861214.536	521.540	0.647
Erro efetivo	105	1870456.230	245.322	0.510
CV (%)		25.90	24.47	0.65

** Significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste F.

4 - CONCLUSÕES

1 Os isolados de PVX: VEL, VIC, P21, P22 e LAV foram os mais agressivos e, portanto, indicados para testar a resistência de clones de batata.

2 As espécies *Nicotiana glutinosa* e *Physalis floridana* podem ser consideradas como excelentes diferenciadoras dos isolados PVX VEL e P21.

3 Foram encontrados vinte e um clones de batata OAS com imunidade ao PVX.

4 Doze clones OAS demonstraram resistência aos onze isolados de PVX e boa produtividade.

5- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRIANUAL - Anuário da Agricultura Brasileira. São Paulo: FNP Consultoria, 2003.

BARBOSA, M. H. P. Capacidade combinatória e comparação entre critérios de seleção de clones de batata (*Solanum tuberosum* L.). 1996. 138 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

BEEMSTER, A. B. R.; DE BOKX. Survey of properties and symptoms. In: De BOKX, J. A.; Van Der WANT, (Ed.). *Viruses of potato and seed potato production*. 2. ed. Wageningen: Pudoc, 1987. p. 84-113.

BRANDOLINI, A.; CALIGARI, P. D. S.; MENDOZA, H. A. Combining resistance to potato leafroll virus (PLRV) with immunity to potato viruses X and Y (PVX and PVY). *Euphytica*, Wageningen, v. 61, n. 1, p. 31-42, Apr. 1992.

BRASIL. Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento. MAPA-Instrução Normativa, n. 18, 05 de Setembro de 2001.

COCKERHAM, G. Genetical studies on resistance to potato viruses X and Y. *Heredity*, Edinburgh, v. 25, n. 6, p. 309-348, 1970.

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

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

FIGUEIRA, A. R. Viroses da batata e suas implicações na produção da batata-semente do estado de Minas Gerais: histórico do problema e soluções. *Summa Phytopathologica*, Piracicaba, v. 21, n. 3/4, p. 269-270, jul./dez. 1995.

FIGUEIRA, A. R.; MORAES, F. R.; PINTO, A. C. S. New PVY necrotic strain is causing great losses in Brazil. *Phytopathology*, St. Paul, v. 86, n. 11, p. S85, Nov. 1996.

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).

FIGUEIRA, A. R.; SOUZA, P. E.; CARDOSO, M. R. O. et al. Ocorrência dos vírus que infectam a batateira na região Sul de Minas Gerais. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v. 10, n. 2, p. 307, jun. 1985. Resumo.

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

HOOKE, W. J. *Compendium of potato diseases*. Saint Paul: American Phytopathological Society, 1981. p. 72-74.

KÖHM, B. A.; GOULDEN, M. G.; GILBERT, J. E.; KAVANAGH, T. A. A potato virus X resistance gene mediates an induced, monospecific resistance in protoplasto. *Plant Cell*, Rockville, v. 5, n. 8, p. 913-920, Aug. 1993.

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

MIZUBUTI, A. Principais viroses da batateira sob condições de Brasil central. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 17, n. 76, p. 46-50, Abr. 1981.

MUNRO, J. Potato virus X. In: HOOKER, W. J. **Compendium of potato diseases**. 1981. p. 72-74.

QUERCI, M.; BAULCOMBE, D. C.; GOLDBACH, R. W.; SALAZAR, L. P. Analysis of the resistance breaking determinants of potato virus X (PVX) Strain HB on different potato genotypes expressing resistance to PVX. **Molecular Plant Pathology**, Binnenhaven, v. 85, n. 9, p. 1003-1010, Sept. 1995.

ROSS, H. **Potato breeding: problems and perspectives**. Berlin: Verlag Paul Parey, 1986. 132 p.

SILVA, O. A. Identificação de clones de batata imunes ao PVX e PVY, adaptados à região Sul de Minas Gerais. **Summa Phytopathologica**, Piracicaba, v. 26, n. 4, p. 297-300, out./dez. 2000.

SINGH, R. Use of *Datura metel* L. as a local lesion host for potato virus X. **American Potato Journal**, Orano, v. 46, n. 9, p. 355-357, Sept. 1969.

SOUZA DIAS, J. A. C. Viroses da batata e suas implicações na produção de batata-semente no Estado de São Paulo. **Summa Phytopathologica**, Piracicaba, v. 21, n. 3/4, p. 264-266, jul./dez. 1995.

SOUZA DIAS, J. A. C.; COSTA, A. S.; ASANO, E. M. Elevada incidência (80%) de sintomas semelhantes ao enrolamento secundário em infecção primária de batatal de semente importada. **Summa Phytopathologica**. Piracicaba, v. 11, n. 1/2. p. 55-56, jan./jun. 1985.

SOUZA DIAS, J. A. C.; COSTA, A. S.; MIRANDA FILHO, H. A. Sintomas da infecção primária causada pelo vírus do enrolamento da folha da batata: uma revisão: **Summa Phytopathologica**, Piracicaba, v. 9, n. 1/2, p. 80-81, jan./jun. 1983.

TALENS, L. T. Potato viruses in the Philippines II: Identification of a ringspot strain of potato virus X. **Philippines Agricultural**, Los Bãnos, v. 62, p. 183-190, july/sept. 1979.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE LAVRAS. Departamento de Engenharia. **Setor de meteorologia**. Lavras, 2002.

VALLEJO, R. F.; COLLINS, W. W.; SCHIAVONE, R. C.; YOUNG, B. J. Extreme resistance to infection by potato virus Y and potato virus X in an advanced hybrid *Solanum phureja*-*S. stenotomum* diploid potato population. **American Potato Journal**, Orano, v. 71, n. 10, p. 617-628, Oct. 1994.

VERMMER, H. Optimizing potato breeding I. The genotypic, environmental and genotype – environment coefficients of variation for tuber yield and other traits in potato (*Solanum tuberosum* L.) under different experimental conditions. **Euphytica**, Wageningen, v. 49, n. 3, p. 229-236, Sept. 1990.

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

CAPÍTULO 3

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE ONZE ISOLADOS DO VÍRUS PVX (*Potato virus X*) DO BRASIL.

RESUMO

SILVA, Oneida de Almeida. Caracterização Molecular de onze isolados do vírus X (*Potato virus X*) do Brasil. Lavras: UFLA, 2003. 51 - 75 p. (Tese – Doutorado em Fitopatologia).

Foram estudados os fragmentos genômicos, referentes à região da capa protéica viral, de onze isolados de PVX (VEL, VIC, LAV, UFU, NR, SJ, UDI, BR, CAN, P21 e P22), provenientes de sementes importadas e dos estados de Minas Gerais, São Paulo, Rio Grande do Sul, Santa Catarina e do Distrito Federal. Esses fragmentos, com 780 nucleotídeos, incluindo o gene da capa protéica (714 pb), foram amplificados por RT-PCR, clonados e seqüenciados, sendo essa seqüência de nucleotídeos e a de aminoácidos correspondentes, comparadas entre si e com outros dezenove isolados disponíveis no banco de gene. O alinhamento dos nucleotídeos mostrou uma identidade de 93 a 99% entre os isolados, sendo a maior identidade observada entre os isolados VIC x BR, UF x LAV e UF x VEL, e a menor entre NR e P21. No alinhamento de aminoácidos, a identidade entre eles variou de 94 (entre UDI e P21) a 100% (entre UF, BR e P22). Quando esses isolados foram comparados a 19 outros isolados do Banco de genes (pertencentes aos grupos 1, 2, 3 e 4), a identidade entre eles foi de 93 a 98% para a seqüência nucleotídica e de 95 a 99% para a seqüência de aminoácidos. A identidade com os isolados do grupo 1 e 3 variou de 93 a 98%, com os do grupo 2 foi de 79 a 80% e com os do grupo 4 foi de 78 a 81%. A identidade de aminoácidos foi de 95 a 99% para os grupos 1 e 3, de 83 a 86% com o grupo 2 e de 88 a 91% com o grupo 4. Os isolados pertencentes ao grupo 2 e 4, que foram empregados na comparação, foram provenientes do Peru e da Bolívia e os isolados 1 e 3, dos Estados Unidos, Canadá, Espanha, Rússia, Estônia e de alguns países asiáticos como China, Japão, Coreia e Taiwan. Provavelmente os 11 isolados de PVX, estudados nesse trabalho, devem ter tido a mesma origem geográfica que os isolados dos grupos 1 e 3 que foram utilizados para comparação.

Comitê Orientador: Antonia dos Reis Figueira – UFLA (Orientadora), Alessandra de Jesus Boari, César Augusto Brasil Pereira Pinto – UFLA.

ABSTRACT

SILVA, Oneida de Almeida. **Molecular characterization of eleven PVX isolates (*Potato virus X*) from Brazil.** Lavras:UFLA, 2003. 51 - 75p. (Tese – Doctor Program in Phytopathology).

In this work were studied genomic fragments from coat protein region of eleven PVX (*Potato virus X*) isolates, named VEL, VIC, LAV, UF, NR, SJ, UDI, BR, CAN, P21 and P22, coming from imported seeds and from several Brazilian states as Minas Gerais, São Paulo, Santa Catarina, Rio Grande do Sul and Distrito Federal. The cDNA fragments with 780 nucleotides, including the coat protein (714bp), obtained by RT-PCR, were cloned, sequenced, and compared among themselves and with nineteen isolates from the gene Bank. The alignment of the nucleotides showed an identity ranging from 93 to 99% among the studied isolates. The higher identity was among the isolates VICxBR, UFxLAV and UFxVEL and the smaller was among NR and P21. The amino acid identity among them ranged from 94 (between UDI and P21) to 100% (among UF, BR, VEL and P22). When the eleven isolates were compared with the gene Bank isolates (belonging to 1, 2, 3 and 4 groups) the nucleotide identity ranged from 93 to 99% and the amino acid identity ranged from 94 to 100%. The nucleotides identity with group 1 and 3 isolates ranged from 93 to 98%, with group 2 isolates was from 79 to 80%, and with group 4 isolates was from 78 to 81%. The amino acid identity with group 1 and 3 was from 95 to 99%, with group 2 was from 83 to 86%, and with group 4 was from 88 to 91%. The geneBank isolates belonging to groups 2 and 4, were from Peru and Bolivia; the isolates 1 and 3 came from USA, Canada, Spain, Russia, Estonia and from some Asiatic country like China, Japan, South Korea and Taiwan. Probably the eleven PVX isolates studied in this work have the same geographic origin of the isolates from the groups 1 and 3, which were used for comparison.

Guidance Committee: Antonia dos Reis Figueira –UFLA (Major Professor),
Alessandra de Jesus Boari, César Augusto Brasil Pereira Pinto – UFLA.

1 INTRODUÇÃO

A cultura da batata é suscetível a um grande número de doenças e pragas, em qualquer parte do mundo em que essa planta é cultivada. Dentre as doenças mais importantes, as viroses se destacam pelo fato de não possuírem um controle curativo e serem eficientemente perpetuadas através dos tubérculos, que causa a sua degenerescência progressiva, inviabilizando esse material para plantio. Isso faz com que os métodos de controle se baseiem em medidas preventivas, como a utilização de cultivares imunes e/ou resistentes ou de tubérculos livres de vírus.

Os programas de melhoramento em andamento na Universidade Federal de Lavras têm se empenhado na obtenção de cultivares de batata resistentes a viroses, incluindo o vírus X (*Potato vírus X- PVX*) que, apesar de não induzir perdas maiores que 10% nas principais cultivares de batata, pode se tornar bem mais agressivo se estiver associado a outros vírus como o PVY (*Potato vírus Y*), induzindo perdas superiores a 50% (Beemster; De Bokx, 1987, Hooker 1981).

O PVX não é transmitido por inseto vetor, contudo uma vez presente num determinado lote de sementes, é extremamente difícil evitar a sua disseminação mecânica, podendo chegar a 100% de incidência após algumas multiplicações das batatas sementes no campo (Berks, 1970; Beemster e De Bokx, 1987; Wilson e Jones, 1990; Theodoluz et al., 1992). Este vírus pertence ao gênero *Potexvirus*, possuindo partículas alongadas e flexuosas, medindo cerca de 470 a 480 nm de comprimento por 13 nm de diâmetro e o seu ácido nucléico é um RNA de fita simples do tipo infeccioso (+). Como a maioria dos vírus conhecidos, o vírus X apresenta uma alta variabilidade genética, sendo que diversas estirpes já foram estudadas e caracterizadas, com base nas propriedades da partícula, solorologia e tipos de sintomas induzidos em plantas de fumo. Cockerham (1970) classificou as estirpes de PVX em quatro grupos, de acordo com a sua capacidade de infectar cultivares de batata portadoras de genes para hipersensibilidade, mostrando que a interação vírus-planta varia com a estirpe do

vírus. Desse modo, é extremamente importante que os geneticistas tenham conhecimento da estirpe de PVX com que estão trabalhando, para a realização dos testes rotineiros de resistência nos clones que estão sendo utilizados nos trabalhos de melhoramento genético.

Com o recente avanço da biotecnologia, o conhecimento da organização do genoma dos vírus de plantas tem aumentado substancialmente, paralelo ao desenvolvimento de técnicas moleculares. A facilidade para obter as sequências de nucleotídeos do genoma completo dos vírus tem permitido esclarecer e entender as estratégias de expressão (Bustamante et al. 1998), bem como auxiliar na identificação e classificação dos vírus (Orman et al., 1990).

Vários métodos têm sido utilizados para se determinar a sequência de nucleotídeos do DNA. Dentre esses, pode-se citar o método enzimático ou de terminação da cadeia com dideoxirribonucleosídeo trifosfato de Sanger, o qual utiliza a DNA polimerase para sintetizar a cópia complementar da fita simples de DNA e se baseia na habilidade da DNA polimerase em usar 2',3'-dideoxynucleotídeos trifosfatos (ddNTPs) como substrato. Os dideoxynucleotídeos trifosfatos não apresentam a hidroxila no carbono 3', uma vez que, incorporados, impedem a adição de outros nucleotídeos, terminando, assim, o alongamento da cadeia (Sanger, 1981; Ausubel, 1995; Passaglia e Zaha, 1996).

Nesse trabalho onze isolados de PVX, provenientes de diferentes regiões produtoras do Brasil e de núcleos de pesquisa em batata, tiveram as suas capas protéicas amplificadas por PCR, clonadas e sequenciadas para a realização de estudos filogenéticos e análise da identidade de nucleotídeos, com outros isolados já descritos, com a finalidade de classificar e catalogar as estirpes de PVX existentes no Brasil.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados sob condições de casa-de-vegetação, e no laboratório de Virologia Vegetal do Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Lavras (DFP/UFLA) e na EMBRAPA – Milho/sorgo, Sete lagoas – MG.

2.1 Origem e Manutenção dos isolados

Parte dos isolados de PVX foi obtida de brotos de tubérculos de batata infectados, provenientes dos municípios de Nova Resende, Lavras, Santa Juliana, Uberlândia e Itapetininga, recebidos para a análise no Centro de Indexação de Vírus Minas Gerais (IMA/UFLA) e parte foi cedida por pesquisadores de Canoinhas (SC), Pelotas (RS), Brasília (DF) e Viçosa (MG). A lista dos isolados está apresentada na Tabela 1. Todos os isolados foram caracterizados por inoculação mecânica em *Gomphrena globosa* e fumo cv. 'TNN' (*Nicotiana tabacum*), por DAS-ELISA e por PCR.

TABELA 1 Nomenclatura e origem dos isolados de PVX estudados DAS-ELISA. Lavras - MG, 2003.

Vírus (Isolado)	Espécie hospedeira	Origem
BR	Batata cv. Monalisa	Brasília - DF
CAN	Batata cv. Achat	Canoinhas - SC
LAV	Batata cv. Monalisa	Lavras - MG
NR	Batata cv. Baraka	Nova Resende - MG
P21	Batata cv. Achat	Pelotas - RS
P22	Batata cv. Achat	Pelotas - RS
SJ	Batata cv. Monalisa	Santa Juliana -MG
UDI	Batata cv. Monalisa	Uberlândia - MG
UF	Batata cv. Monalisa	Lavras - MG
VEL	Batata cv. Velox	Itapetininga -SP
VIC	Fumo 'TNN'	Viçosa - MG

2.2 Caracterização Molecular

2.2.1 Purificação parcial viral

O procedimento utilizado na purificação parcial dos isolados de PVX foi o mesmo descrito por Lane (1992). Após 7 dias de inoculação, 2g de folhas de fumo (*Nicotiana glutinosa*) com sintomas de virose foram macerados com o auxílio de nitrogênio líquido, na presença de 15 mL de tampão de citrato de amônia (0,1 M, pH 6,5) contendo 150 µL de iodoacetamida (0,25 M), 150 µL de Na-Dieca (0,15 M) e 50 µL de 2-Mercapthoetanol. O extrato foi filtrado em gaze dupla, transferido para tubos e centrifugado a 8.000 g (rotor SA600-Sorval) por 10 minutos. O sobrenadante foi transferido para tubos de policarbonato contendo 1 ml de Triton X-100 e agitado até a dissolução completa. Em seguida, a solução foi centrifugada em almofada de sacarose (20%), a 29.500 rpm (rotor AS600-Sorval) por 150 minutos, eliminando-se o sobrenadante. O 'pellet' foi re-suspendido em 1 mL de tampão de fosfato de potássio (0,05 M), pH7,2, por uma noite. Após a centrifugação da solução em microcentrífuga, a 8000 rpm por cinco minutos, o vírus em solução foi coletado e armazenado a 4 °C.

2.2.2 Extração do RNA viral

Para fazer a extração do RNA viral a partir de 100 µL de solução do vírus concentrado, foi adicionado 100 µL de água destilada e 50 µL de tampão de extração (Tris-glicina 0,2 M, NaCl 0,2 M, EDTA 20 mM, pH 9,5), 20 µL de SDS (20%) e 2,7µL de solução de proteinase K (20 mg/mL). A solução foi agitada, centrifugada a 14.000 rpm por 2 minutos (Centrifuga Eppendorf 5402) e incubada a 37 °C por uma hora. As proteínas virais foram removidas pela adição de fenol/clorofórmio (1:1 v/v.), agitação e centrifugação a 14.000 rpm por 15 minutos. A fase aquosa (250 µL) foi transferida para tubo limpo e novamente submetida ao tratamento com fenol/clorofórmio, agitação e centrifugação a 14.00 rpm por 15 minutos. A fase aquosa foi transferida para tubo limpo e o RNA foi precipitado pela

adição de 1/20 volume de acetato de sódio (3M, pH 5,5) e 2,5 volumes de etanol absoluto. A solução foi incubada a -20 °C por uma hora e, em seguida, centrifugada por 30 minutos a 14.000 rpm, descartando-se o sobrenadante. Os 'pellets' foram lavados com etanol (70%), secados a vácuo por cinco minutos e re-suspendidos em 20 ml de água ultrapura, autoclavada. O RNA foi então analisado em gel de agarose (0,8%). As preparações purificadas foram armazenadas a -80 °C.

2.2.3 RT-PCR

Para a síntese inicial do cDNA foram utilizados 3µL do RNA viral (aproximadamente 2,5µg), 1µL do primer reverse e 8µL de água tratada com dietilpirocarbamato (DEPC). O material foi incubado a 70 °C por 10 minutos e imediatamente incubado em gelo por 5 minutos. Em seguida, foram adicionados 2 µL RT buffer 5X, 2 µL de MgCl₂ (25 mM), 1µL dNTP (10 mM), 2µL de DTT (0,1M) e 0,5µl da enzima transcriptase reversa. Essa mistura foi incubada a 42°C por 50 minutos. Em seguida fez-se a incubação da reação por 15 minutos a 70 °C para inativação da enzima.

Após a obtenção do cDNA este foi amplificado por PCR, utilizando-se 5 µL do cDNA, 5 µL do tampão de reação 10X (0,5 M Tris-HCl; 0,7 M KCl; 0,1 M; MgCl₂ pH 8,0), 3 µL de MgCl₂ (25 mM), 1µL dNTP (10 mM), 1 µL da Taq DNA Polimerase, 31 µL de água ultra pura, 2 µL do oligonucleotídeo específico para o gene da proteína capsidial do PVX (5' CCGTTGAGCGGTTAAGTT 3') e 2 µL do segundo primer 2 (5' CTGGGGTAGGCGTCGGTT 3'), especialmente desenhados para serem utilizados neste trabalho (Figura 1). A reação consistiu de 35 ciclos conforme segue: desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento a 55 °C por 1 minuto e extensão a 72 °C por 2 minutos, com uma incubação final a 72 °C por 12 minutos. Foi retirada uma alíquota de 5 µL do produto amplificado para análise em gel de agarose (0,8%). Esses primers permitiram a amplificação de um fragmento de 780 pb para todos os isolados.

Esse fragmento contém todos os nucleotídeos do gene da capa protéica (711 pb), que tem sido a região mais estudada dos *Potexvirus*. Os primers foram também utilizados nos testes iniciais de diagnóstico do PVX por meio de RT-PCR, que é uma das técnicas mais sensíveis para detecção de vírus de plantas (Hadidi et al., 1993; Figueira et al., 1997; Vunsh, 1990).

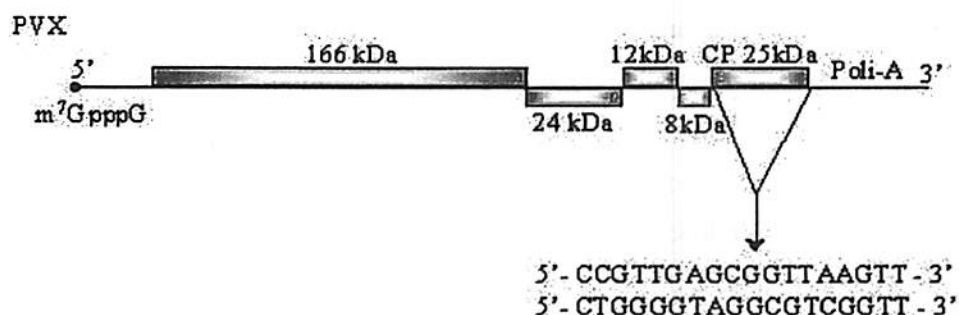


FIGURA 1. Esquema do genoma do PVX.

2.2.4. Clonagem e sequenciamento

Os fragmentos amplificados por RT-PCR foram clonados no vetor PCR 2.1 utilizando o "Kit" TOPO TA (Invitrogen, San Diego, EUA), de acordo com as recomendações do fabricante e utilizando-se as técnicas convencionais descritas por Sambrook (1989). Foram utilizados 1 μ L do produto fresco da PCR, 1 μ L da solução salina diluída, 1 μ L do plasmídeo PCR TOPO vector e 2 μ L de água esterilizada. A reação foi incubada por cinco minutos à temperatura ambiente e 2 μ L foram transferidos para tubos contendo células competentes de *E. Coli*, para transformação das mesmas. Os tubos foram colocados por 30 minutos no gelo, 30 segundos em banho-maria a 42 °C e novamente no gelo por

cinco minutos. Após a adição de 280 µL do meio SOC, o material foi incubado sob agitação a 37 °C por 30 minutos.

Para crescimento das colônias utilizaram-se placas de Petri com meio sólido 2 YT (16 g de Triptona, 10 g de Extrato de Levedura e 5 g de NaCl em 1000 mL de água destilada) contendo kanamicina, previamente revestidas com 2 YT líquido (40 µL), X-GAL (50 µL) e IPTG (10µL). Em seguida 150 µL da suspensão de células bacterianas foram espalhadas em cada placa com alça de Drigalski e as placas foram incubadas a 37 °C durante a noite.

As colônias transformadas (brancas) foram individualmente transferidas para tubos contendo 2,5 mL de 2 YT líquido. Os tubos foram incubados a 37 °C sob agitação por 12 horas.

Os plasmídeos recombinantes foram purificados pelo método da lise alcalina e submetidos à clivagem com a enzima de restrição *EcoR* 1, a fim de se comprovar a presença do fragmento clonado. A concentração dos plasmídeos foi estimada em gel de agarose (0,8%).

A purificação dos plasmídeos, para o sequenciamento, foi feita pelo método de Acetato de sódio (NH₄OAc) (Sambrook et al., 1998). 1,5 mL de suspensão de células bacterianas foram transferidas para tubos de microcentrífuga e submetidos a 14.000 rpm por dois minutos. O sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspensionado em 100 µL da solução I (25 mM Tris HCl pH 8,0; 10 mM EDTA e 50 mM D-Glucose), deixando-se em repouso por cinco minutos à temperatura ambiente. Em seguida adicionaram-se 200 µL da solução II (0,2 N NaOH e 10% SDS) misturando-se gentilmente por inversão dos tubos. Após cinco minutos em repouso no gelo, foram adicionadas 150 µL de acetato de amônio 10,5 M, mantendo-se os tubos no gelo por 15 minutos. Em seguida, foi centrifugado a 14.000 rpm por 15 minutos e 400µL do sobrenadante foi transferido para novos tubos, adicionando-se 600 µL de isopropanol, incubando-se no gelo por 15 minutos e em seguida submetido à centrifugação. O sedimento foi

lavado com 1 mL de etanol 70% e ressuspendido em 25 μ L de TE+ RNase.

Todos os plasmídeos foram colocados em um mesmo tubo completando-se o volume, com TE livre de RNase, para 500 μ L. Adicionou-se o mesmo volume de fenol/clorofórmio (1:1). A fase aquosa (400 μ L), após agitação e centrifugação, foi transferida para um novo tubo, ao qual foi adicionado volume igual de clorofórmio para se retirar o excesso de fenol. Novamente transferiu-se a fase aquosa para um novo tubo, ao qual foi adicionado 1/10 do volume de NaOAc (3M pH 5,5) e 2,5 volumes de etanol absoluto. Nessa fase o tubo foi colocado no freezer -80°C para precipitação do DNA. Após centrifugação, o sedimento foi lavado em etanol 70%, ressuspendido em 40 μ L de água ultrapura, sendo então utilizado para o sequenciamento.

Os plasmídeos recombinantes foram sequenciados utilizando-se o método ‘fluorescent-primer’s’ (auto cycle kit Pharmacia), segundo instruções do fabricante, e os oligonucleotídeos M13 reverso e M13-40. Os DNAs amplificados de cinco isolados foram submetidos ao sequenciamento no aparelho A.L.F. DNA sequencer (Pharmacia Biotech) no laboratório de Virologia-DFP e os outros sete isolados foram sequenciados no laboratório da EMBRAPA- Sete Lagoas, usando-se o kit “Big Due terminator ready reaction mixture” (Applied Biosystems, Foster City, CA) de acordo com as recomendações dos fabricantes e analisados em um sequenciador ABI Prism 377 (Applied Biosystems). Os 11 isolados de PVX foram sequenciados a partir do nucleotídeo 5736 a 6450 e comparados entre si e com isolados já publicados no “Gene Bank” (Tabela 2), utilizando-se o programa BLAST (Altschul et al. 1997), CLUSTALW 1.6 (Thompson et al. 1994) e MEGA ver 2.000. A partir, desses dados foi possível gerar as árvores filogenéticas.

TABELA 2 Isolados de PVX (*Potato virus X*) usados nesse estudo. Lavras - MG, 2003.

Isolados	Grupo	Origem	Número do Acesso
KO ₁	1	Coreia do Sul	AF260640
KO ₂	1	Coreia do Sul	AF260641
PVX _{US}	1	Estados Unidos	X88788
PXV _{CP}	2	Peru	Orman et al., (1990)
AF202462	3	Canadá	AF202462
PVX _{Taiwan}	3	Taiwan	AF272736
AF534912	3	China	AF534912
D87962	3	Japão	D87962
E01310	3	Estados Unidos	E01310
Nc-001455	3	Rússia	Nc-001455
PVX _{CT23}	3	Rússia	M38655
PVX _{GEN}	3	Rússia	M38480
PVX _{KP}	3	Estados Unidos	X88783
PVX _{N11}	3	Estados Unidos	X88784
PVX _{SP1}	3	Espanha	AJ505748
PVX3	3	Rússia	Ornam et al., (1990)
PVX _{SKCP3}	3	Estonia	Z29335
PVX _{CPN}	4	Perú	Goulden et al., (1993)
PVX _{HB}	4	Bolívia	Goulden et al., (1993)

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Comparação da seqüência de nucleotídeos e aminoácidos da região da capa protéica dos isolados de PVX.

Após o alinhamento múltiplo das seqüências nucleotídicas dos onze isolados entre si (Figura 1A), utilizando-se o programa GCG~, verificou-se que a identidade entre eles apresentou variação de 93 a 99%, sendo que o maior valor observado foi entre os isolados UF x LAV, UF x VEL e VIC x BR e o menor foi entre NR e P21 (Tabela 1 A).

No alinhamento múltiplo das seqüências dos aminoácidos referentes ao fragmento amplificado, dos onze isolados entre si (Figura 2A), foi verificada uma identidade entre 94 a 100% entre os isolados (Tabela 2A). Os isolados UF, BR, VEL e P22 foram idênticos, com uma identidade de 100% , enquanto que o UDI, e P21 apresentaram a menor identidade, ou seja, 94%.

Examinando a árvore filogenética, com bootstrap, obtida com base nas seqüências de nucleotídeos dos isolados de PVX, com 2000 repetições, observou-se divisão em 2 grandes grupos (Figura 2). O grupo 1, com bootstrap de 99%, foi composto pelos isolados UF, LAV, NR e VEL. Os outros seis isolados (P21, P22, BR, SJ, UDI, VIC e CAN) ficaram no segundo grupo, subdividido, com o P21 num subgrupo e com os demais isolados no outro subgrupo.

Na árvore filogenética, com bootstrap (Figura 3), obtida também com 2000 repetições, com base nas seqüências de aminoácidos, os isolados se distribuíram de modo ligeiramente diferente. Eles se subdividiram em dois grupos, sendo que o isolado P21 encontra-se no primeiro grupo e os demais isolados no segundo grupo. O segundo grupo se subdividiu em outros dois subgrupos, ficando o UDI no primeiro subgrupo e os demais no segundo.

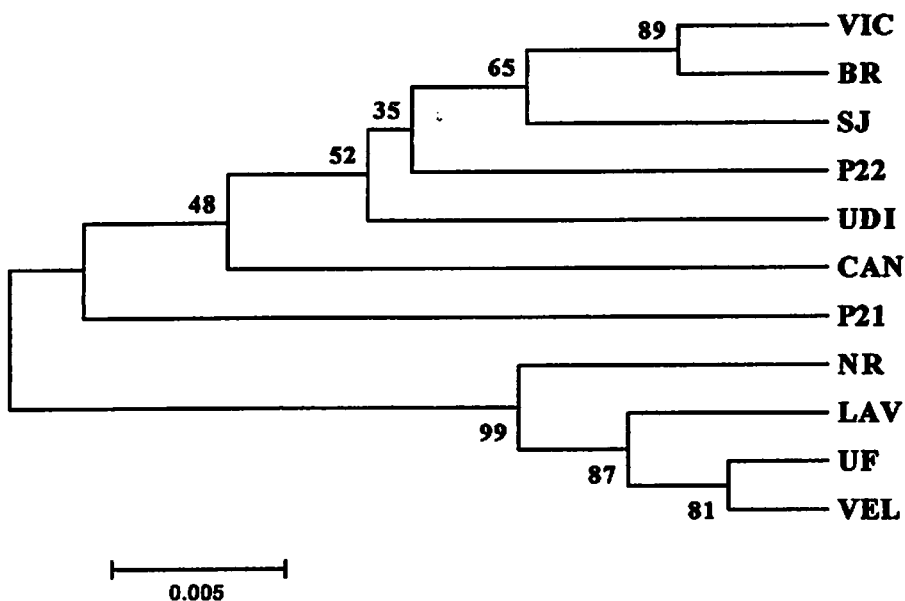


FIGURA 2 – Árvore filogenética obtida com base nas seqüências de nucleotídeos da região da capa protéica de 11 isolados de PVX. Os valores de bootstrap foram obtidos através do programa MEGA ver 2.1, com 2.000 repetições, sendo mostrado os valores acima de 99%. Lavras - MG, 2003.

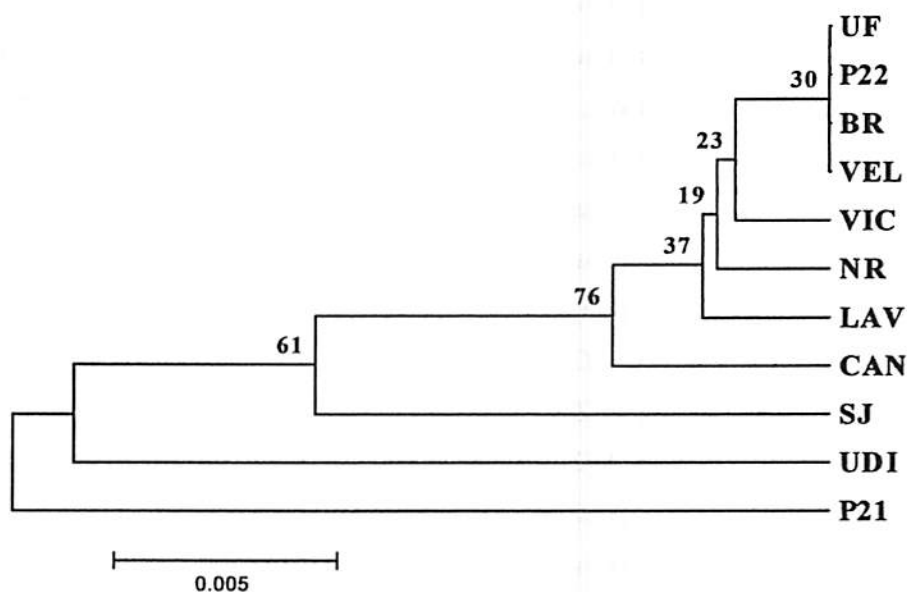
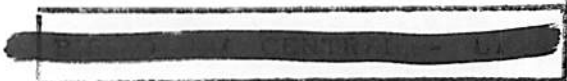


FIGURA 3- Árvore filogenética obtida com base nas seqüências de aminoácidos da região da capa protéica de 11 isolados de PVX. Os valores de bootstrap foram obtidos através do programa MEGA ver 2.1, com 2.000 repetições. Lavras-MG, 2003.

O alinhamento dos 714 nucleotídeos dos onze isolados com os disponíveis no Banco de genes pode ser observado na Figura 3A. Na Tabela 3A, observa-se que a maior identidade (98%) foi entre os isolados BR, P22 e VIC e o acesso X88783 dos Estados Unidos do grupo 3 e entre os isolados UF, LAV e o isolado acesso Z29335 de Tallin (Estônia), também do grupo 3. Os onze isolados mostraram 93 a 98 % de identidade com os isolados do grupo 1, 79 a 80% com os isolados do grupo 2, e 93 a 98% com o grupo 3 e de 78 a 81% com o grupo 4.

Comparando-se a identidade de aminoácidos dos onze isolados com os disponíveis no Banco de Genes (Figura 4A) verificou-se uma identidade de 83 a 100% (Tabela 4A). Os isolados BR, P22, UF, VEL apresentaram 100% de identidade com os isolados AF202462, AF272736, AJ505748, X88783, X88784,



pertencentes ao grupo 3. Esses mesmos isolados apresentaram 95 a 99% de identidade com os isolados pertencentes ao grupo 1; de 83 a 86% de identidade com os isolados do grupo 2, de 95 a 99% com os isolados do grupo 3 e de 88 a 91% com os isolados pertencentes ao grupo 4.

Na árvore filogenética (Figura 4), obtida com base nas sequências nucleotídicas dos onze isolados com os disponíveis no banco de genes, verificam-se três grandes grupos. No primeiro grupo, com bootstrap de 100 %, concentram-se os isolados em estudos UF, NR, LAV, P22, BR, VIC, VEL, CAN, SJ, UDI e P21 juntamente com outros 16 isolados do Banco de genes (Z29335, PVXX3, D87962, AF272736, AF202462, X88784, X88783, AJ505748, AF260641, AF260640, AF534912, E01310, M38655, M38480, NC 001455 e X88788), classificados nos grupos 1 e 3 por Cockerham (1970). Entre esses 16 isolados do banco de genes, quatro são de países Asiáticos (China, Coreia do Sul e Japão), quatro dos Estados Unidos, quatro da Rússia, um do Canadá, um da Espanha e um da Estônia. No segundo grupo, com bootstrap de 100%, se localizam o isolados do Peru (PVX_{CP}), da Bolívia (PVX_{HB}) e o isolado do Peru (PVX_{CP}), classificado nos grupos 2 e 4. Portanto, os isolados do Brasil devem ter tido a mesma origem geográfica dos isolados descritos nos Estados Unidos, Canadá e em países Asiáticos e Europeus.

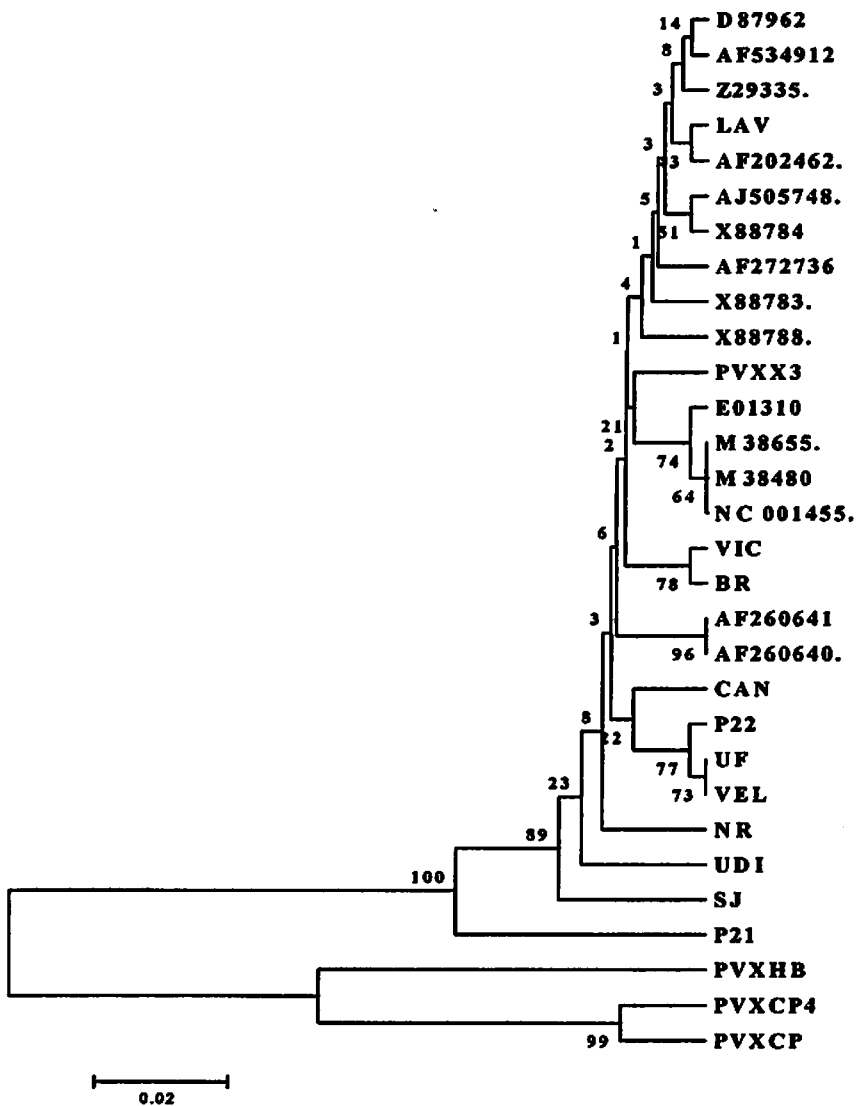


FIGURA 4 Árvore filogenética obtida com base nas seqüências de nucleotídeos da região da capa protéica de onze isolados de PVX com os dezoito isolados de PVX disponíveis no Banco de genes classificados nos grupos 1, 2, 3 e 4 de acordo com Cockerham (1970). Os valores de bootstrap foram obtidos através do programa MEGA ver 2.1, com 2.000 repetições. Lavras-MG, 2003.

Na árvore filogenética, com base nas sequências de aminoácidos dos onze isolados de PVX com os dezoitos disponíveis no Banco de genes (Figura 5), obtida com bootstrap, com 2.000 repetições, os isolados foram distribuídos em 3 grandes grupos. Nota-se uma tendência dos onze isolados se concentrarem entre os isolados do grupo 1 e 3, com 99% de confiança. Os isolados do Peru, PVX_{CP4} e PVX_{HB}, com 100% de confiança no grupo 2 e o isolado da Bolívia PVX_{CP} no grupo 4.

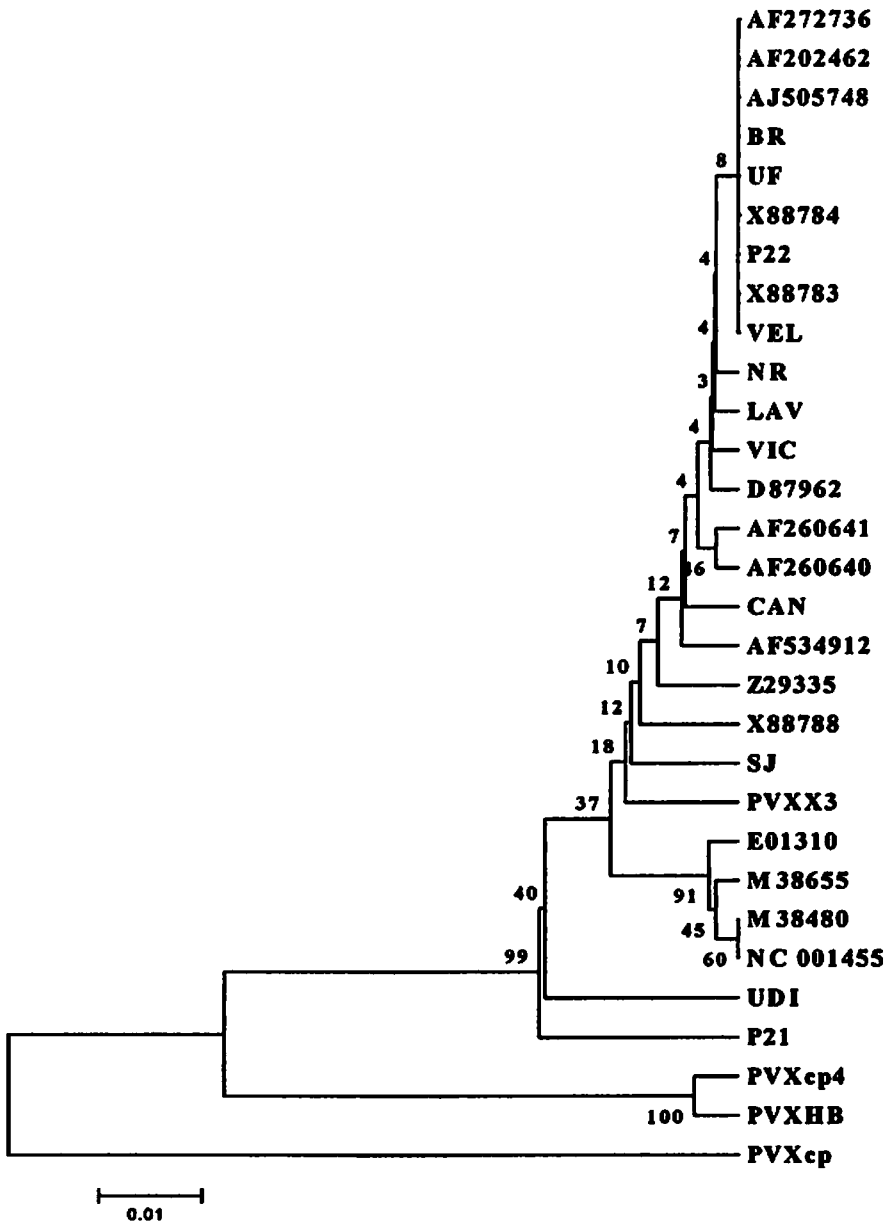


FIGURA 5 Árvore filogenética obtida com base nas seqüências de aminoácidos do gene da capa protéica dos onze isolados de PVX com os dezotitos isolados disponíveis no Banco de Genes. Valores de bootstrap obtidos com 2.000 repetições. Lavras-MG, 2003.

3.2 Relação da região estudada da capa protéica com a patogenicidade do PVX.

Santa Cruz; Baulcombe (1995) analisaram as sequências de diferentes estirpes de PVX (NL1 e XS do grupo 1; DY, EX e WS2 do grupo 2; DX, KP, UK3 e XA do grupo 3 e NL4 e HB do grupo 4) e observaram que a comparação da sequência de aminoácidos da capa protéica poderia diferenciá-las em duas classes, designadas tipo X e B, baseando-se no tamanho da proteína e na identidade dos aminoácidos. Esses autores verificaram que todas as estirpes do tipo X se diferenciaram, em quatorze aminoácidos, das estirpes do tipo B. O tipo X da capa protéica mostrou identidade de 97 a 100% de identidade de aminoácidos e comprimento de 237 aminoácidos, enquanto o tipo B foi dividido em dois subtipos, com base no comprimento da proteína: Bi com 248 aa e tipo Bii com 236 aa. Essa diferenciação foi correlacionada com a origem geográfica das estirpes, sendo o subtipo Bi observado entre as estirpes da Europa enquanto que o subtipo Bii entre as estirpes da América do Norte e do Sul. Considerando-se essa classificação, os onze isolados estudados nesse trabalho deveriam ser classificados dentro do grupo 3, tipo X, pois todos possuem 237 aminoácidos, tendo eles, provavelmente, a mesma origem geográfica dos isolados dos Estados Unidos, Canadá, Rússia e países Asiáticos.

A região estudada do PVX, correspondente à capa protéica, parece estar envolvida em muitos aspectos na interação vírus x planta, tais como a morfologia do vírus, indução de sintomas nas plantas, acúmulo de RNA genômico e apresenta um importante papel na patogenicidade viral (Kavanaght et al., 1992). Diferentes estirpes de vírus têm sido diferenciadas de acordo com sua compatibilidade as genes de resistências Nx, Nb que induzem resistência de hipersensibilidade e Rx (locus Rx1 e Rx2) que confere resistência extrema a cultivares de batata (Cockerham 1970; Feiglstock et al., 1995). Quando a resistência é conferida por

ambos os genes *Nx* e *Rx1* tem-se verificado que o gene da capa protéica é o principal determinante de resposta ao hospedeiro (Kavanagh et al., 1992 e Goulden et al., 1993).

A diferenciação entre os tipos X e B da capa protéica parece estar correlacionada à capacidade das diferentes estirpes de superar a resistência mediada por *Nx*. Assim, as estirpes do grupo 1 e 3, que induzem resistência mediada por *Nx*, têm o tipo X, enquanto que as estirpes pertencentes aos grupos 2 e 4 que superam a resistência mediada pelo *Nx*, têm o tipo B (Santa Cruz; Baulcombe, 1995). Esses autores verificaram, também, que todas as estirpes avaliadas, com exceção da *PVX_{HB}*, proveniente da Bolívia, não foram capazes de quebrar a resistência mediada por *Rx1* e que todas essas estirpes tinham o resíduo de treonina na posição 121, enquanto que a estirpe HB possuía o resíduo lisina nessa posição. Conforme já verificado por Feigelstoch et al. (1995), o códon 122 e o 128 nas estirpes do grupo Andino corresponde ao códon 121 e ao 127, respectivamente, outras estirpes, devido à deleção do aminoácido 29 em seus genomas. Todos os isolados de *PVX*, estudados neste trabalho, possuem a treonina na posição 122 e a metionina na posição 128, que também ocorre com a grande maioria dos isolados utilizados para comparação.

Alguns autores acreditam que a resistência mediada por *Rx* é induzida quando ocorre interação, direta ou indireta, do produto *Rx* da hospedeira com a proteína da capa de todos os isolados de *PVX*. O resíduo de treonina na posição 121 é conservado na capa protéica de todos os isolados conhecidos, exceto para a estirpe *PVX_{HB}*, e parece estar diretamente envolvido nessa interação (Ornam et al., 1990; Köhm et al. 1993). Goulden et al. (1993), analisando uma série de híbridos e isolados mutantes de *PVX_{HB}* e *PVX_{CP4}*, ambas do grupo 4, concluíram que a extrema resistência na cultivar Cara (carrega o locus *Rx1*) foi afetada pelos aminoácidos 121 e 127 do gene da capa protéica, sendo que o aminoácido 121 mostrou-se como o maior determinante. Verificaram que, quando havia os resíduos lisina e arginina nas

posições 121 e 127 observava-se quebra de resistência, por outro lado quando havia a treonina e a arginina, nestas posições, não ocorria quebra de resistência.

Esses resultados coincidiram com os de Querci et al., (1995) os quais observaram que a capacidade de quebra de resistência pela estirpe PVX_{HB} é determinada pelos resíduos lisina e arginina nas posições 121 e 127 do gene da capa protéica e afeta todos os genes testados até o momento (Rx_{ac} (*Solanum acaule*), Rx_{adg} (*S. andigena*), Rx_{cha}, Rx_{cur}, Rx_{juz} e Rx_{vrn} encontradas em *S. vernei*). Por outro lado, Kavangh et al. (1992) lembram que outras partes da molécula, provavelmente, estejam envolvidas na indução de resistência, pois há evidências experimentais de que uma deleção na sequência do domínio N-terminal da capa protéica, entre os resíduos 140 e 183, isto é, fora da posição 121, transforma um isolado não virulento num isolado capaz de quebrar a resistência.

4 CONCLUSÕES

1. Considerando a sequência de nucleotídeos da região da capa protéica, observou-se identidade de 93 a 99% entre os isolados de PVX estudados, sendo a maior identidade observada entre os isolados VIC x BR, UF x LAV e UF x VEL com 99% e a menor entre NR e P21 com 93%.
2. O alinhamento dos onze isolados estudados com os disponíveis no Banco de genes indicou uma identidade entre eles de 93 a 99% para a sequência nucleotídica e de 94 a 99% para a sequência de aminoácidos.
3. Os onze isolados quando comparados a 19 outros isolados do banco de genes, apresentaram identidade de nucleotídeos de 93 a 97% com os isolados pertencentes aos grupos 1 e 3, de 79 a 80% com o grupo 2 e 78 a 81% com o grupo 4.

4. A identidade de aminoácidos foi de 95 a 99% para os grupos 1 e 3, de 76 a 83% com o grupo 2 e de 88 a 91% com o grupo 4. Os isolados pertencentes aos grupos 2 e 4, que foram empregados comparação, foram provenientes do Peru e da Bolívia, e os isolados 1 e 3, dos Estados Unidos, Canadá, Espanha, Rússia e de alguns países asiáticos como China, Japão, Coreia do Sul.

5. Provavelmente os 11 isolados de PVX, estudados neste trabalho, devem ter tido a mesma origem geográfica que os isolados dos grupos 1 e 3 que foram utilizados para comparação.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALTSCHUL, S. F.; MADDEN, T. L.; SHAFFER, A.; MILLER, W.; LIPMAN, D. J. "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs." *Nucleic Acids Research*, Oxford, v. 25, n. 17, p. 3389-3402, Sept. 1997.

AUSUBEL, F. M. (Ed.). *DNA Sequence: Overview of DNA sequencing methods in short protocols in molecular biology*. 3. ed. 1995.

BEEMSTER, A. B. R.; DE BOKX. Survey of properties and symptoms. In: De BOKX, J. A.; Van Der WANT, (Ed.). *Viruses of Potato and Seed Potato Production*. 2. ed. Wageningen: Pudoc, 1987. p. 84-113.

BERCKS, R. *Potato virus X*. Kew: Commonwealth Mycological Institute/ Association of Applied Biologists, 1970. 4 p. (Descriptions of Plant Viruses, 4).

BUSTAMANTE, P. I.; HULL, R. Plant virus gene expression strategies. *Electronic Journal of Biotechnology*, Chile, v. 1, n. 15, Aug. 1998.

COCKERHAM, G. Genetical studies on resistance to potato viruses X and Y. *Heredity*, Edinburgh, v. 25, n. 6, p. 309-348, 1970.

FEIGELSTOCK, D. A.; TOZZINI, A. C.; HOPP, H. E. Coat protein sequence of a resistance-breaking strain of potato virus X isolated in Argentina. *Virus Genes*, Moron, v. 10, n. 3, p. 289-292, 1995.

FIGUEIRA, A. R.; DOMIER, L. L.; DÁRCY, C. J. Comparison of techniques of detection of barley yellow dwarf virus – PAV-IL. *Plant Disease*, Adelaide, v. 81, n. 11, p. 1236-1239, Nov. 1997.

GOULDEN, M. G.; KOHM, B. A.; SANTA CRUZ, S. BANCOLMBE, D. C. A feature of the coat protein of potato virus X affects both induced virus resistance in potato and viral fitness. *Virology*, Orlando, v. 197, n. 1, p. 293-302, Nov. 1993.

HADIDI, A, MONSTASER, M. S.; LEVY, L.; GOTH, R. W.; CONVERSE, R. H. Detection of potato leafroll and strawberry mild yellow-edge luteovirus by reverse transcription-polymerase chain reaction amplification. *Plant Disease*, St. Paul, v. 77, n. 6, p. 595-601, June 1993.

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

KAVANAGH, T.; GOULDEN, M.; SANTA CRUZ, S.; BARKER, I.; CHAPMAN, S. Molecular analysis of a resistance-breaking strain of potato virus X. *Virology*, Orlando, v. 189, n. 2, p. 609-617, Aug. 1992.

KÖHM, B. A.; GOULDEN, M. G.; GILBERT, J. E.; KAVANAGH, T. A. A potato virus X resistance gene mediates an induced, monospecific resistance in protoplasts. *Plant Cell*, Rockville, v. 5, n. 8, p. 913-920, Aug. 1993.

LANE, L. A general method for detection of plant viruses. In: MARAMOROSCH, K. *Plant Diseases of viral, viroid, mycoplasma and uncertain origin*. New Delhi: Oxford e IBM Publishing, 1992. p. 1-15.

ORMAN, B. E.; CELNIK, R. M.; MANDEL, A. M. Complete cDNA sequence of a South American isolate of potato virus X. *Virus Research*, Buenos Aires, v. 16, p. 293-306, 1990.

PASSAGLIA, L. M. P.; ZAHA, A. Técnicas de DNA recombinante. In: *Biología molecular básica*. Porto Alegre: Mercado Aberto, 1996. 336 p.

QUERCI, M.; BAULCOMBE, D. C.; GOLDBACH, R. W.; SALAZAR, L. F. Analysis of the resistance breaking determinants of potato virus X (PVX) Strain HB on different potato genotypes expressing resistance to PVX. *Molecular Plant Pathology*, Binnenhaven, v. 85, n. 9, p. 1003-1010, Sept. 1995.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. Cold harbor laboratory press. 2. ed. New York, 1989. v. 1.

SANGER, F. Determination of nucleotide sequences in DNA. *Science*, Madison, v. 214, n. 4526, p. 1205-1214, Dec. 1981.

SANTA CRUZ, S.; BAULCOMBE, D. Analysis of potato virus X coat protein genes in relation to resistance conferred by the genes Nx, NB and Rx1 of potato. *Journal General Virology*, Norwich, v. 76, n. 8, p. 2057-2061, Aug. 1995.

THEODOLUZ, R. Virus content of seed potato stocks produced in a unique seed potato production scheme. *American Potato Journal*, Orano, v. 66, n. 8, p. 449-459, Aug. 1992.

THOMPSON, J. D.; DIGGINS, D. G.; GIBSON, T. J. Clustal W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight choice. *Nucleic Acids Research*, Oxford, v. 22, n. 22, p. 4673-4680, Nov. 1994.

VUNSH, R.; ROSNER, A.; STEIN, A. The use of polymerase chain reaction (PCR) for the detection of bean yellow mosaic virus in gladiolus. *Annals of Applied Biology*, New Brunswick, v. 117, n. 3, p. 561-569, Dec. 1990

WILSON, C. R.; JONES, R. A. C. Virus content of seed potato stocks produced in a unique seed potato production scheme. *Annals of Applied Biology*, New Brunswick, v. 116, n. 1, p. 103-109, Feb. 1990.

ANEXOS

TABELA 1A. Porcentagem de identidade na sequência de nucleotídeo do gene da capa protéica entre os isolados estudados. Lavras - MG, 2003.

	BR	CAN	LAV	NR	P21	P22	SJ	UDI	UF	VEL	VIC
BR	—	97	96	95	96	97	98	97	96	96	99
CAN		—	96	95	95	97	96	95	97	96	96
LAV			—	98	94	95	94	95	99	98	95
NR				—	93	94	94	94	98	98	94
P21					—	97	95	95	94	94	95
P22						—	97	96	96	96	97
SJ							—	97	95	95	98
UDI								—	95	95	98
UF									—	99	96
VEL										—	95
VIC											—

TABELA 2A. Porcentagem de identidade na seqüência de aminoácidos do gene da capa protéica entre os isolados estudados. Lavras - MG, 2003.

	BR	CAN	LAV	NR	P21	P22	SJ	UDI	UF	VEL	VIC
BR	—	99	96	95	96	97	98	97	96	96	99
CAN		—	98	99	96	99	97	96	99	99	98
LAV			—	99	96	99	97	96	99	99	99
NR				—	96	99	97	96	99	99	99
P21					—	97	95	94	97	97	97
P22						—	97	97	100	100	99
SJ							—	95	97	97	98
UDI								—	97	97	96
UF									—	100	99
VEL										—	99
VIC											—

TABELA 3A. Porcentagem de identidade na sequência de nucleotídeo do gene da capa protéica entre os isolados estudados em comparação com a sequência de outros isolados de PVX depositadas no genBank. Lavras - MG, 2003.

	BR	CAN	LAV	NR	P21	P22	SJ	UDI	UF	VEL	VIC
AF60640	95	95	96	95	93	95	94	94	97	96	95
AF60641	95	95	95	95	93	94	94	94	96	96	95
X88788	95	94	96	95	93	95	94	93	96	96	94
PVX _{CP}	8	80	79	79	79	80	80	79	80	79	80
AF202462	96	96	96	95	94	96	94	95	96	96	95
AF272736	95	96	97	96	94	95	94	95	97	97	95
AF534912	97	97	97	96	95	97	96	96	97	96	97
D87962	96	95	97	96	93	95	95	95	97	97	96
E01310	96	96	95	94	94	96	95	94	96	95	96
NC001455	96	96	95	95	95	96	95	95	96	96	96
M38655	96	96	95	94	94	96	95	94	96	95	96
M38480	96	96	95	95	95	96	95	95	96	96	96
X88783	98	97	97	95	96	98	97	97	97	96	98
X88784	96	95	97	96	93	95	95	95	97	96	96
AJ505748	97	97	96	96	95	97	96	96	97	96	97
PVX _{X3}	95	95	95	95	93	95	94	94	96	95	95
Z29335	95	95	98	97	93	95	94	94	98	97	95
PVX _{CP4}	81	80	80	80	80	81	81	80	81	80	81
PVX _{HB}	79	79	80	80	78	80	79	78	80	80	79

TABELA 4A. Porcentagem de identidade na sequência aminoácidos do gene da capa protéica entre os isolados estudados em comparação com a sequência de outros isolados de PVX depositadas no genBank. Lavras - MG, 2003.

	BR	CAN	LAV	NR	P21	P22	SJ	UDI	UF	VEL	VIC
AF260640	99	98	99	99	96	99	97	96	99	99	99
AF260641	99	98	98	98	96	99	97	96	99	99	98
X88788	98	97	97	98	95	98	96	95	98	98	97
PVX _{CP}	86	85	86	86	83	86	86	84	86	86	86
AF202462	100	99	99	99	97	100	97	97	100	100	99
AF272736	100	99	99	99	97	100	98	97	100	100	99
AF534912	99	98	98	98	96	99	97	96	99	99	98
D87962	99	98	99	99	96	99	97	96	99	99	99
E01310	97	97	97	97	94	97	95	94	97	97	97
NC001455	98	97	97	97	95	98	96	95	98	98	97
M38655	97	97	97	97	94	97	95	94	97	97	97
M38480	98	97	97	97	95	98	96	95	98	98	97
X88783	100	99	99	99	97	100	97	97	100	100	99
X88784	100	99	99	99	97	100	97	97	100	100	99
AJ505748	100	99	99	99	97	100	97	97	100	100	99
PVX _{X3}	98	97	97	97	95	98	96	95	98	98	97
Z29335	99	98	98	98	96	99	97	96	99	99	98
PVX _{CP4}	90	88	90	90	88	90	91	88	90	96	91
PVX _{FB}	91	90	91	91	88	91	91	89	91	91	91

```

5650
BR ATGTCAGCACCAGCTAGCACAACACAGGCCACAGGGTCAACTACCTCAACTACCACAAAA
CAN ATGTCAGCACCAGCTAGCACAACACAGGCCACAGGGTCAACTACTTCAACTACCACAAAA
LAV ATGTCAGCACCAGCTAGCACAACACAGGCCACAGGGTCAACTACCTCAACTACCACAAAA
NR ATGTCAGCACCAGCTAGTACAACACAGGCCACAGGGTCAACTACCTCAACTACCACAAAG
P21 ATGTCAGGACCAGCTAGCACAACACAGGCCACAGGGTCCACTACCTCAACTACCACAAAA
P22 ATGTCGGCACCAGCTAGCACAACACAGGCCACAGGGTCCACTACCTCAACTACCACAAAA
SJ ATGTCAACACCAGCTAGCACTACACAGGCCATAGGGTCAACTACCTCAACTACCACAAAA
VIC ATGTCAACACCAGCTAGCACAACACAGGCCACAGGGTCAACTACCTCAACTACCACAAAA
UDI ATGTCAGCACCAGCTAGCACAACACAGGCCATAGGGTCCACTACCTCAACTACCACAAAA
UF ATGTCAGCACCAGCTAGCACAACACAGGCCACAGGGTCAACTACCTCAACTACCACAAAA
VEL ATGTCGGCACCAGCTAGCACAACACAGGCCACAGGGTCAACTACCTCAACTACCACAAAA
*****.***** **.****** *****.***** *****

5710
BR ACTGCAGGCGCAACTCCTGCCACAGCTTCCAGGACTGTTACCATCCCGGATGGGGACTTC
CAN ACTGCAGGCGCAACTCCTGCCACAGCTTCCAGGACTGTTACCATCCCGGATGGGGACTTC
LAV ACTGCAGGCGCAACTCCTGCCACAGCTTCCAGGACTGTTACCATCCCGGATGGGGATTTTC
NR ACTGCAGGCGCAACTCCTGCCACAGCTTCCAGGACTGTTACCATCCCGGATGGGGATTTTC
P21 ACTGCAGGCGCAACTCCTGCCACAGCTTCCAGGACTGTTACCATCCCGGATGGGGATTTTC
P22 ACTGCAGGCGCAACTCCTGCCACAGCTTCCAGGACTTTTACCATCCCGGATGGGGATTTTC
SJ ACTGCAGGCGCAACTCCTGCCACAGTTTCCAGGACTGTTACCATCCCGGATGGGGATTTTC
UDI ACTGCAGGCGTAACCTCCTGCCACAGCTTCCAGGACTGTTACCATCCCGGATGGGGATTTTC
UF ACTGCAGGCGCAACTCCTGCCACAGCTTCCAGGACTGTTACCATCCCGGATGGGGATTTTC
VEL ACTGCAGGCGCAACTCCTGCCACAGCTTCCAGGACTGTTACCATCCCGGATGGGGATTTTC
VIC ACTGCAGGCGCAACTCCTGCCACAGCTTCCAGGGCTGTTACCATCCCGGATGGGGATTTTC
***** ***** *****.* ***** ***** *****

5770
BR TTTAGTACAGCCCGTGCTATAGTAGCCAGCAATGCCGTGCAACAAATGAGGACCTCAGC
CAN TTTAGTACAGCCCGTGCTATAGTAGCCAGCAATGCCGTGCAACAAATGAGGACCTCAGC
LAV TTTAGCACAGCCCGTGCCATAGTAGCCAGCAATGCCGTGCAACAAATGAGGACCTCAGC
NR TTTAGCACAGCAGCTGCCATAGTAGCCAGCAATGCCGTGCAACAAATGAGGACCTCAGC
SJ TTTAGTACAGCCCGTGCTATAGTAGCCAGCAATGCCGTGCAACAAATGAGGACCTCAGC
P21 TTTAGTACAGCCCGTGCTATAGTAGCCAGCAATGCCGTGCGGACAAATGAGGACCTCAGC
P22 TTTAGTACAGCCCGTGCTATAGTAGCCAGCAATGCCGTGCAACAAATGAGGACCTCAGC
UDI TTTAGTACAGCCCGTGCTATAGTAGCCAGCAATGCCGTGCGGACAAATGAGGACCTCAGC
UF TTTAGCACAGCCCGTGCCATAGTAGCCAGCAATGCCGTGCAACAAATGAGGACCTCAGC
VEL TTTAGCACAGCCCGTGCCATAGTAGCCAGCAATGCCGTGCAACAAATGAGGACCTCAGC
VIC TTTAGTACAGCCCGTGCTATAGTAGCCAGCAATGCCGTGCGGACAAATGAGGACCTCAGC
***** ***** ***** ***** ***** *****
"..."

```

FIGURA 1A. Alinhamento das seqüências de nucleotídeos da capa protéica do gene dos onze isolados. Lavras - MG, 2003.

FIGURA 1A. "CONT."

5830

5889

BR AAGATTGAGGCCATCTGGAAGGACATGAAGGTGCCACAGACACTATGGCACAGGCTGCT
CAN AAGATTGAGGCTATCTGGAAGGACATGAAGGTGCCACAGACACTATGGCACAGGCTGCT
LAV AAGATTGAGGCTATTTGGAAGGACATGAAGGTGCCACAGACACTATGGCACAGCCGCT
NR AAGATTGAGGCTATTTGGAAGGACATGAAGGTGCCACAGACACTATGGCTCAAGCCGCG
P21 AAGATTGAGGCTATCTGGAAGGACATGAAGGTGCTACAGACACTATGGCACAGGCTGCT
P22 AAGATTGAGGCGATCTGGAAGGACATGAAGGTGCCACAGACACTATGGCACAGGCTGCT
SJ AAGATTGAGGCCATCTGGAAGGACATGAAGGTGCCACAGACACTATGGCACAGGCTGCT
UDI AAGATTGAGGCCATCTGGAAGGACATGAAGGTGCCACAGACACTATGGCACAGGCTGCT
UF AAGATTGAGGCTATTTGGAAGGACATGAAGGTGCCACAGACACTATGGCACAGCCGCT
VEL AAGATTGAGGCTATTTGGAAGGACATGAAGGTGCCACAGACACTATGGCACAGCCGCG
VIC AAGATTGAGGCCATCTGGAAGGACATGAAGGTGCCACAGACACTATGGCACAGGCTGCT
***** ** *****:*. ** **

5890

5949

BR TGGGACTTAGTCAGACACTGCGCTGATGTGGGTTTCATCTGCCCAAACAGAAATGATAGAT
CAN TGGGACTTAGTCAGACACTGCGCTGATGTGGGCTCATCTGCCCAAACAGAAATGATAGAT
LAV TGGGACTTAGTCAGACACTGTGCTGATGTGGGCTCATCTGCTCAAACAGAAATGATAGAT
NR TGGGACTTAGTCAGACACTGTGCTGATGTGGGCTCATCTGCTCAAACAGAGATGATAGAT
P21 TGGGACTTAGTCAGACACTGCGCTGATGTGGGCTCATCTGCCCAAACAGAAATGATAGAT
P22 TGGGACTTAGTCAGACACTGCGCTGATGTGGGCTCATCTGCCCAAACAGAAATGATAGAT
SJ TGGGACTTAGTCAGACACTGCGCTGATGTGGGTTTCATCTGCCCAAACAGAAATGATAGAT
UDI TGGGACTTAGTCAGACACTGCGCTGATGTGGGTTTCATCTGCCCAAACAGAAATGATAGAT
UF TGGGACTTAGTCAGACACTGTGCTGATGTGGGCTCATCTGCTCAAACAGAAATGATAGAT
VEL TGGGACTTAGTCAGACACTGTGCTGATGTGGGCTCATCTGCTCAAACAGAGATGATAGAT
VIC TGGGACTTAGTCAGACACTGCGCTGATGTGGGTTTCATCTGCCCAAACAGAAATGATAGAT
***** *****.*****

5950

6009

BR ACAGGCCCTATTCCAACGGCATCAGCAGGGCCAGACTAGCAGCAGCAATTAAGAGGGTG
CAN ACAGGTCCTTATTCCAACGGCATCAGCAGAGCCAGACTGGCAGCAGCAATTAAGAAGTG
LAV ACAGGTCCTTATTCAAACGGCATCAGCAGAGCTAGACTGGCAGCAGCGATTAAGAGGGTG
NR ACAGGTCCTTATTCAAACGGCATCAGCAGAGCTAGACTGGCAGCAGCGATTAAGAAGTG
P21 ACTGGCCCTTACTCCAACGGCATCAGCAGGGCCAGACTAGCAGCAGCAATTAAGAGGGTG
P22 ACAGGCCCTTACTCCAACGGCATCAGCAGGGCCAGACTAGCAGCAGCAATTAAGAGGGTG
SJ ACAGGCCCTTATTCCAACGGCATCAGCAGGGCCAGACTAGCAGCAGCAATTAAGAGGGTG
UDI ACAGGCCCTTATTCCAACGGCATCAGCAGGGCCAGACTAGCAGCAGCGATTAAGAGGGTG
UF ACAGGTCCTTATTCAAACGGCATCAGCAGAGCTAGACTGGCAGCAGCGATTAAGAGGGTG
VEL ACAGGTCCTTATTCAAACGGCATCAGCAGAGCTAGACTGGCAGCAGCGATTAAGAGGGTG
VIC ACAGGCCCTTATTCCAACGGCATCAGCAGGGCCAGACTAGCAGCAGCAATTAAGAGGGTG
:* ** ** *..***.*** ** *..*****.*****.***

"...Continua..."

FIGURA 1A. "CONT."

6190 6249
 BR ATCCGGCCACCGTCTGAAGCTGAAATGAATGCTGCCCAAACCTGCTGCCTTTGTGAAGATT
 CAN ATCCGGCCACCGTTCGAAGCTGAAATGAATGCTGCCCAAACCTGCTGCCTTTGTGAAGATC
 LAV ATCCGGCCACCGTCTGAAGCTGAAATGAATGCTGCCCAAACCTGCTGCCTTTGTGAAGATT
 NR ATCCGGCCACCGTCTGAAGCTGAAATGAATGCTGCCCAAACCTGCTGCCTTTGTGAAGATT
 P21 ATCCGGCCACCGTCTGAAGCTGAAATGAATGCTGCCCAAACCTGCTGCCTTTGTGAAATTT
 P22 ATCCGGCCACCGTCTGAAGCTGAAATGAATGCTGCCCAAACCTGCTGCCTTTGTGAAGATT
 SJ ATCCGGCCACCGTCTGAAGCTGAAATGAATGCTGCCCAAACCTGCTGCCTTTGTGAAGATT
 UDI ATCCGGCCACCGTCTGAAGCTGAAATCAATGCTGCCCATACTGCTGCCTTTGTGAATATT
 UF ATCCGGCCACCGTCTGAAGCTGAAATGAATGCTGCCCAAACCTGCTGCCTTTGTGAAGATT
 VEL ATCCGGCCACCGTCTGAAGCTGAAATGAATGCTGCCCAAACCTGCTGCCTTTGTGAAGATT
 VIC ATCCGGCCACCGTCTGAAGCTGAAATGAATGCTGCCCAAACCTGCTGCCTTTGTGAAGATT

6250 6309
 BR ACAAAGGCCAGGGCGCAATCCAACGACTTTGCCAGCCTAGATGCAGCTGTCACCTCGAGGT
 CAN ACAAAGGCCAGGGCACAATCCAACGACTTTGCCAGCCTAGATGCAGCTGTCACCTCGAAGT
 LAV ACGAAGGCCAGGGCACAATCCAACGACTTTGCCAGCCTAGATGCAGCTGTCACCTCGAGGT
 NR ACGAAGGCCAGGGCACAATCCAACGACTTTGCCAGCCTAGATGCAGCTGTCACCTCGAGAT
 P21 ACTAAGGCCAGGGCACAATCCAACGACTTTGCCGCCCTTGATCCAGCTGTCACCTCCAGGT
 P22 ACTAAGGCCAGGGCACAATCCAACGACTTTGCCAGCCTAGATGCAGCTGTCACCTCGAGGT
 SJ ACAAAGGCCAGGGCACAATCCAACGACTTTGCCAGCCTAGATGCAGCTGTCACCTCGAGGT
 UDI ACAAAGGCCAGGGCACAATCCAACGACTTTGCCAGCCTAGATGCAGCTGTCACCTCGAGGT
 UF ACAAAGGCCAGGGCACAATCCAACGACTTTGCCAGCCTAGATGCAGCTGTCACCTCGAGGT
 VEL ACAAAGGCCAGGGCACAATCCAACGACTTTGCCAGCCTAGATGCAGCTGTCACCTCGAGGT
 VIC ACAAAGGCCAGGGCGCAATCCAACGACTTTGCCAGCCTAGATGCAGCTGTCACCTCGAGGT
 ** ***** . ***** . ***:*** ***** *..*

6310 6363
 BR CGTATCACTGGAACAACAACCGCTGAGGCTGTAGTCACTCTCCCACCACCATAA
 CAN CGTATCACTGGAACAACAACCGCTGAAGCTGTTGTCACTCTCCCACCACCATAA
 LAV CGTATCACTGGAACAACAACCGCTGAGGCTGTTGTCACTCTCCCACCACCATAA
 NR CGTATCACGGGAACAACAACCGCTGAGGCTGTTGTCACTCTGCCACCACCATAA
 P21 CGCATCACTGGAACAACAACCGCTGAGGCTGTTGTCACTCTCCCACCACCATAA
 P22 CGTATCACTGGAACAACAACCGCTGAAGCTGTTGTCACTCTCCCACCACCATAA
 SJ CGTATCACTGGAACAACATCCGCTGAAGCTGTTGTCACTCTCCCACCACCATAA
 UDI CGTATCACGGGAACAACAACCGCTGAGGCTGTTGTCACTCTCCCACCACCATAA
 UF CGTATCACTGGAACAACAACCGCTGAAGCTGTTGTCACTCTCCCACCACCATAA
 VEL CGTATCACTGGAACAACAACCGCTGAAGCTGTTGTCACTCTCCCACCACCATAA
 VIC CGTATCACTGGAACAACAACCGCTGAGGCTGTTGTCACTCTCCCACCACCATAA
 ** *****:*****.*****:**** ** *****

1 60

BR MSAPASTTQATGSTTSTTTKTAGATPATASGLFTIPDGDFSTARAIVASNAVATNEDLS
 CAN MSAPASTTQATGSTTSTTTKTAGATPATASGLFTIPDGDFSTARAIVASNAVATNEDLS
 LAV MSAPATTTQATGSTTSTTTKTAGATPATASGLFTIPDGDFSTARAIVASNAVATNEDLS
 NR MSAPASTTQATGSTTSTTTKTAGATPATASGLFTIPDGDFSTARAIVASNAVATNEDLS
 P21 MSGPASTTQATGSTTSTTTKTAGATPATASGLFTIPDGDFSTARAIVASNAVATNEDLS
 P22 MSAPASTTQATGSTTSTTTKTAGATPATASGLFTIPDGDFSTARAIVASNAVATNEDLS
 SJ MSTPASTTQAIIGSTTSTTTKTAGATPATVSGLFTIPDGDFSTARAIVASNAVATNEDLS
 UDI MSAPASTTQAIIGSTTSTTTKTAGVTPATASGLFTIPDGDFSTARAIVASNAVATNEDLS
 UF MSAPASTTQATGSTTSTTTKTAGATPATASGLFTIPDGDFSTARAIVASNAVATNEDLS
 VEL MSAPASTTQATGSTTSTTTKTAGATPATASGLFTIPDGDFSTARAIVASNAVATNEDLS
 VIC MSTPASTTQATGSTTSTTTKTAGATPATASGLFTIPDGDFSTARAIVASNAVATNEDLS
 ** *:**** *****.****.*****

61 120

BR KIEAIWKDMKVPTDTMAQAAWDLVRHCADVGSSAQTEMIDTGPYSNGISRARLAAAIVE
 CAN KIEAIWKDMKVPTDTMAQAAWDLVRHCADVGSSAQTEMIDTGPYSNGISRARLAAAIVE
 LAV KIEAIWKDMKVPTDTMAQAAWDLVRHCADVGSSAQTEMIDTGPYSNGISRARLAAAIVE
 NR KIEAIWKDMKVPTDTMAQAAWDLVRHCADVGSSAQTEMIDTGPYSNGISRARLAAAIVE
 P21 KIEAIWKDMKVPTDTMAQAAWDLVRHCADVGSSAQTEMIDTGPYSNGISRARLAAAIVE
 P22 KIEAIWKDMKVPTDTMAQAAWDLVRHCADVGSSAQTEMIDTGPYSNGISRARLAAAIVE
 SJ KIEAIWKDMKVPTDTMAQAAWDLVRHCADVGSSAQTEMIDTGPYSNGISRARLAAAIVE
 UDI KIEAIWKDMKVPTDTMAQAAWDLVRHCADVGSSAQTEMIDTGPYSNGISRARLAAAIVE
 UF KIEAIWKDMKVPTDTMAQAAWDLVRHCADVGSSAQTEMIDTGPYSNGISRARLAAAIVE
 VEL KIEAIWKDMKVPTDTMAQAAWDLVRHCADVGSSAQTEMIDTGPYSNGISRARLAAAIVE
 VIC KIEAIWKDMKVPTDTMAQAAWDLVRHCADVGSSAQTEMIDTGPYSNGISRARLAAAIVE

121 180

BR CTLRQFCMKYAPVVWNWMLTNNSPANWQAQGFKEPKHFAAFDFFNQVTPAAIMPKEGL
 CAN CTLRQFCMKYAPVVWNWMLTNNSPANWQAQGFKEPKHFAAFDFFNQVTPAAIMPKEGL
 LAV CTLRQFCMKYAPVVWNWMLTNNSPANWQAQGFKEPKHFAAFDFFNQVTPAAIMPKEGL
 NR CTLRQFCMKYAPVVWNWMLTNNSPANWQAQGFKEPKHFAAFDFFNQVTPAAIMPKEGL
 P21 CTLRQFCMKYAPVVWNWMLTNNSPANWQAQGFKEPKHFAAFDFFNQVTPAAIMPKEGL
 P22 CTLRQFCMKYAPVVWNWMLTNNSPANWQAQGFKEPKHFAAFDFFNQVTPAAIMPKEGL
 SJ CTLRQFCMKYAPVVWNWMLTNNSPANWQAQGFKEPKHFAAFDFFNQVTPAAIMPKEGL
 VEL CTLRQFCMKYAPVVWNWMLTNNSPANWQAQGFKEPKHFAAFDFFNQVTPAAIMPKEGL
 VIC CTLRQFCMKYAPVVWNWMLTNNSPANWQAQGFKEPKHFAAFDFFNQVTPAAIMPKEGL
 UDI CTLRQFCMKYAPVVWNWMLTNNSPAKWQAQGFKEPKHFAAFDFFNQVTPAAIMPKEGL
 UF CTLRQFCMKYAPVVWNWMLTNNSPANWQAQGFKEPKHFAAFDFFNQVTPAAIMPKEGL
 *****.*****.**:****.*****

“...Continua...”

FIGURA 2A. Alinhamento das seqüências de aminoácidos do gene da capa protéica dos onze isolados. Lavras -MG, 2003.

FIGURA 2A. "CONT."

	181	237
BR	IRPPSEAEMNAAQTAAFVKITKARASNDNFASLDAVTRGRITGTTTAEAVVTLPPP	
CAN	IRPPFEAEMNAAQTAAFVKITKARASNDNFASLDAVTRSRITGTTTAEAVVTLPPP	
LAV	IRPPSEAEMNAAQTAAFVKITKARASNDNFASLDAVTRGRITGTTTAEAVVTLPPP	
NR	IRPPSEAEMNAAQTAAFVKITKARASNDNFASLDAVTRDRITGTTTAEAVVTLPPP	
P21	IRPPSEAEMNAAQTAAFVKITKARHQSNDFAALDPAVTPGRITGTTTAEAVVTLPPP	
P22	IRPPSEAEMNAAQTAAFVKITKARASNDNFASLDAVTRGRITGTTTAEAVVTLPPP	
SJ	IRPPSEAEMNAAQTAAFVKITKARASNDNFASLDAVTRGRITGTTTAEAVVTLPPP	
UDI	IRPPSEAEINAAHTAAFVNITKARASNDNFASLDAVTRGRITGTTTAEAVVTLPPP	
UF	IRPPSEAEMNAAQTAAFVKITKARASNDNFASLDAVTRGRITGTTTAEAVVTLPPP	
VEL	IRPPSEAEMNAAQTAAFVKITKARASNDNFASLDAVTRGRITGTTTAEAVVTLPPP	
VIC	IRPPSEAEMNAAQTAAFVKITKARASNDNFASLDAVTRGRITGTTTAEAVVTLPPP	
	**** *:***:****:***** *****:*. ** .*****:***** ****	

5650
VIC ATGTCACACCCAGCTAGCAACACACAGGCCACAGGGTCAACTACCTCAACTACCCACAAA 5709
SJ ATGTCACACCCAGCTAGCACTACACAGGCCATAGGGTCAACTACCTCAACTACCCACAAA
BR ATGTAGCACCCAGCTAGCAACACACAGGCCACAGGGTCAACTACCTCAACTACCCACAAA
UDI ATGTAGCACCCAGCTAGCAACACACAGGCCATAGGGTCAACTACCTCAACTACCCACAAA
P21 ATGTAGCACCCAGCTAGCAACACACAGGCCACAGGGTCAACTACCTCAACTACCCACAAA
P22 ATGTAGCACCCAGCTAGCAACACACAGGCCACAGGGTCAACTACCTCAACTACCCACAAA
X88783. ATGTAGCACCCAGCTAGCAACACACAGGCCACAGGGTCAACTACCTCAACTACCCACAAA
CAN ATGTAGCACCCAGCTAGCAACACACAGGCCACAGGGTCAACTACCTCAACTACCCACAAA
AJ505748. ATGTAGCACCCAGCTAGCAACACACAGGCCACAGGGTCAACTACCTCAACTACCCACAAA
AF534912 ATGTAGCACCCAGCTAGCAACACACAGGCCACAGGGTCAACTACCTCAACTACCCACAAA
M38480 ATGTAGCACCCAGCTAGCAACACACAGGCCACAGGGTCAACTACCTCAACTACCCACAAA
E01310 ATGTAGCACCCAGCTAGCAACACACAGGCCACAGGGTCAACTACCTCAACTACCCACAAA
NC 001455. ATGTAGCACCCAGCTAGCAACACACAGGCCACAGGGTCAACTACCTCAACTACCCACAAA
M38655. ATGTAGCACCCAGCTAGCAACACACAGGCCACAGGGTCAACTACCTCAACTACCCACAAA
AF202462. ATGTAGCACCCAGCTAGCAACACACAGGCCACAGGGTCAACTACCTCAACTACCCACAAA
AF260641 ATGTAGCACCCAGCTAGCAACACACAGGCCACAGGGTCAACTACCTCAACTACCCACAAA
AF260640. ATGTAGCACCCAGCTAGCAACACACAGGCCACAGGGTCAACTACCTCAACTACCCACAAA
X88788. ATGTAGCACCCAGCTAGCAACACACAGGCCACAGGGTCAACTACCTCAACTACCCACAAA
NR ATGTAGCACCCAGCTAGCAACACACAGGCCACAGGGTCAACTACCTCAACTACCCACAAA
VEL ATGTAGCACCCAGCTAGCAACACACAGGCCACAGGGTCAACTACCTCAACTACCCACAAA
UF ATGTAGCACCCAGCTAGCAACACACAGGCCACAGGGTCAACTACCTCAACTACCCACAAA
LAV ATGTAGCACCCAGCTAGCAACACACAGGCCACAGGGTCAACTACCTCAACTACCCACAAA
Z29335. ATGTAGCACCCAGCTAGCAACACACAGGCCACAGGGTCAACTACCTCAACTACCCACAAA
PVXK3 ATGTAGCACCCAGCTAGCAACACACAGGCCACAGGGTCAACTACCTCAACTACCCACAAA
D87962. ATGTAGCACCCAGCTAGCAACACACAGGCCACAGGGTCAACTACCTCAACTACCCACAAA
AF272736 ATGTAGCACCCAGCTAGCAACACACAGGCCACAGGGTCAACTACCTCAACTACCCACAAA
X88784 ATGTAGCACCCAGCTAGCAACACACAGGCCACAGGGTCAACTACCTCAACTACCCACAAA
PVXCP4 ATGACTACCCAGCCCAACCCACTCAAGCTGTAGGATCCACCAATCAACTACCCACCCACT
PVX ATGACTACCCAGCCCAACCCACTCAAGCTGTAGGATCCACCAATCAACTACCCACCCACT
PVXHB *** * ***** * ** ** * ** ** * ** ** * ** ** * ** ** * ** *
“...Continua...”

FIGURA 3A. Alinhamento das sequências de nucleotídeos do gene da capa protéica de PVX de onze isolados estudados e de isolados disponíveis no genBank. Lavras – MG, 2003.

FIGURA 3A. "CONT."

5710
 VIC ACTGCAGGGCGAACTCCTGCCACAGCTTCAGGGCTGTTC-ACCATCCCGGATGGGGATTT
 SJ ACTGCAGGGCGAACTCCTGCCACAGTTCAGGACTGTTC-ACCATCCCGGATGGGGATTT
 BR ACTGCAGGGCGAACTCCTGCCACAGTTCAGGACTGTTC-ACCATCCCGGATGGGGACTT
 UDI ACTGCAGGGCGTAACTCCTGCCACAGCTTCAGGACTGTTC-ACCATCCCGGATGGGGATTT
 P21 ACTGCAGGGCGAACTCCTGCCACAGCTTCAGGACTGTTC-ACCATCCCGGATGGGGATTT
 P22 ACTGCAGGGCGAACTCCTGCCACAGTTCAGGACTGTTC-ACCATCCCGGATGGGGATTT
 X88783. ACTGCAGGGCGAACTCCTGCCACAGTTCAGGACTGTTC-ACCATCCCGGATGGGGACTT
 CAN ACTGCAGGGCGAACTCCTGCCACAGTTCAGGACTGTTC-ACCATCCCGGATGGGGACTT
 AJ505748. ACTGCAGGGCGAACTCCTGCCACAGTTCAGGACTGTTC-ACCATCCCGGATGGGGACTT
 AF534912 ACTGCAGGGCGAACTCCTGCCACAGTTCAGGACTGTTC-ACCATCCCGGATGGGGATTT
 M38480 ACTGCAGGGCGAACTCCTGCCACAGTTCAGGACTGTTC-ACCATCCCGGATGGGGATTT
 E01310 ACTGCAGGGCGAACTCCTGCCACAGTTCAGGACTGTTC-ACCATCCCGGATGGGGATTT
 NC 001455. ACTGCAGGGCGAACTCCTGCCACAGTTCAGGACTGTTC-ACCATCCCGGATGGGGATTT
 M38655. ACTGCAGGGCGAACTCCTGCCACAGTTCAGGACTGTTC-ACCATCCCGGATGGGGATTT
 AF202462. ACTGCAGGGCGAACTCCTGCCACAGTTCAGGACTGTTC-ACCATCCCGGATGGGGATTT
 AF260641 ACTGCAGGGCGAACTCCTGCTACAGCTTCAGGACTGTTC-ACCATCCCGGATGGGGATTT
 AF260640. ACTGCAGGGCGAACTCCTGCTACAGCTTCAGGACTGTTC-ACCATCCCGGATGGGGATTT
 X88788. ACTGCAGGGCGAACTCCTGCCACAGTTCAGGACTGTTC-ACCATCCCGGATGGGGATTT
 NR ACTGCAGGGCGAACTCCTGCCACAGTTCAGGACTGTTC-ACCATCCCGGATGGGGATTT
 VEL ACTGCAGGGCGAACTCCTGCCACAGTTCAGGACTGTTC-ACCATCCCGGATGGGGATTT
 UF ACTGCAGGGCGAACTCCTGCCACAGTTCAGGACTGTTC-ACCATCCCGGATGGGGATTT
 LAV ACTGCAGGGCGAACTCCTGCCACAGTTCAGGACTGTTC-ACCATCCCGGATGGGGATTT
 Z29335. ACTGCAGGGCGAACTCCTGCCACAGTTCAGGACTGTTC-ACCATCCCGGATGGGGATTT
 PVX3 ACTGCAGGGCGAACTCCTGCCCG---CTCAGGCCTGTTC-ACCATCCCGGATGGGGATTT
 D87962. ACTGCAGGGCGAACTCCTGCCACAGTTCAGGACTGTTC-ACTATCCCGGATGGGGATTT
 AF272736 ACTGCAGGGCGAACTCCTGCCACAGTTCAGGACTGTTC-ACCATCCCGGATGGGGATTT
 X88784 ACTGCAGGGCGAACTCCTGCCACAGTTCAGGACTGTTC-ACCATCCCGGATGGGGATTT
 PVXCP4 ACTGCAGGGCGAACTCCTGCCAA---TTCAGGGCTATTC-ACTATACCAGATGGGGACTT
 PVX ACTGCAGGGCGAACTCCTGCCAA---TTCAGGGCTATTCACCATACCAGATGGGGACTT
 PVXHB ACTGCAGGGCGAACTCCTGCTAA---CTCAGGGCTGTTC-ACCATCCCGGATGGGGACTT

 ***** ** ** ** **
 ***** ** ** **

"...Continua..."

FIGURA 3A. "CONT."

5769 5828

VIC CTTTGTAGTACAGCCCGTGTCTATAGTAGCCAGCAATGCCGTGCGAACAAATGAGGACCTCAG
 SJ CTTTGTAGTACAGCCCGTGTCTATAGTAGCCAGCAATGCCGTGCGAACAAATGAGGACCTCAG
 BR CTTTGTAGTACAGCCCGTGTCTATAGTAGCCAGCAATGCCGTGCGAACAAATGAGGACCTCAG
 UDI CTTTGTAGTACAGCCCGTGTCTATAGTAGCCAGCAATGCCGTGCGAACAAATGAGGACCTCAG
 P21 CTTTGTAGTACAGCCCGTGTCTATAGTAGCCAGCAATGCCGTGCGAACAAATGAGGACCTCAG
 P22 CTTTGTAGTACAGCCCGTGTCTATAGTAGCCAGCAATGCCGTGCGAACAAATGAGGACCTCAG
 X88783. CTTTGTAGTACAGCCCGTGTCTATAGTAGCCAGCAATGCCGTGCGAACAAATGAGGACCTCAG
 CAN CTTTGTAGTACAGCCCGTGTCTATAGTAGCCAGCAATGCCGTGCGAACAAATGAGGACCTCAG
 AJ505748. CTTTGTAGTACAGCCCGTGTCTATAGTAGCCAGCAATGCCGTGCGAACAAATGAGGACCTCAG
 AF534912 CTTTGTAGTACAGCCCGTGTCTATAGTAGCCAGCAATGCCGTGCGAACAAATGAGGACCTCAG
 M38480 CTTTGTAGTACAGCCCGTGTCTATAGTAGCCAGCAATGCCGTGCGAACAAATGAGGACCTCAG
 E01310 CTTTGTAGTACAGCCCGTGTCTATAGTAGCCAGCAATGCCGTGCGAACAAATGAGGACCTCAG
 NC_001455. CTTTGTAGTACAGCCCGTGTCTATAGTAGCCAGCAATGCCGTGCGAACAAATGAGGACCTCAG
 M38655. CTTTGTAGTACAGCCCGTGTCTATAGTAGCCAGCAATGCCGTGCGAACAAATGAGGACCTCAG
 AF202462. CTTTGTAGTACAGCCCGTGTCTATAGTAGCCAGCAATGCCGTGCGAACAAATGAGGACCTCAG
 AF260641 CTTTGTAGTACAGCCCGTGTCTATAGTAGCCAGCAATGCCGTGCGAACAAATGAGGACCTCAG
 AF260640. CTTTGTAGTACAGCCCGTGTCTATAGTAGCCAGCAATGCCGTGCGAACAAATGAGGACCTCAG
 X88788. CTTTGTAGTACAGCCCGTGTCTATAGTAGCCAGCAATGCCGTGCGAACAAATGAGGACCTCAG
 NR CTTTGTAGTACAGCCCGTGTCTATAGTAGCCAGCAATGCCGTGCGAACAAATGAGGACCTCAG
 VEL CTTTGTAGTACAGCCCGTGTCTATAGTAGCCAGCAATGCCGTGCGAACAAATGAGGACCTCAG
 UF CTTTGTAGTACAGCCCGTGTCTATAGTAGCCAGCAATGCCGTGCGAACAAATGAGGACCTCAG
 LAV CTTTGTAGTACAGCCCGTGTCTATAGTAGCCAGCAATGCCGTGCGAACAAATGAGGACCTCAG
 Z29335. CTTTGTAGTACAGCCCGTGTCTATAGTAGCCAGCAATGCCGTGCGAACAAATGAGGACCTCAG
 PVX3 CTTTGTAGTACAGCCCGTGTCTATAGTAGCCAGCAATGCCGTGCGAACAAATGAGGACCTCAG
 D87962. CTTTGTAGTACAGCCCGTGTCTATAGTAGCCAGCAATGCCGTGCGAACAAATGAGGACCTCAG
 AF272736 CTTTGTAGTACAGCCCGTGTCTATAGTAGCCAGCAATGCCGTGCGAACAAATGAGGACCTCAG
 X88784 CTTTGTAGTACAGCCCGTGTCTATAGTAGCCAGCAATGCCGTGCGAACAAATGAGGACCTCAG
 PVXCP4 CTTTGTAGTACAGCCCGTGTCTATAGTAGCCAGCAATGCCGTGCGAACAAATGAGGACCTCAG
 PVX CTTTGTAGTACAGCCCGTGTCTATAGTAGCCAGCAATGCCGTGCGAACAAATGAGGACCTCAG
 PVXHB CTTTGTAGTACAGCCCGTGTCTATAGTAGCCAGCAATGCCGTGCGAACAAATGAGGACCTCAG
 *** * ** ** ** * ** ** ** * ** ** * ** ** * ** * ** ** * ** * ** ** * ** * ** * ** ** * ** * **

"...Continua.."

FIGURA 3A. "CONT."

6069

VIC GTGACGCTTAGGCAATTTTGCATGAAGTATGCCCCAGTGGTATGGAACCTGGATGCTGAC
 SJG GTGCACACTTAGGCAATTTTGCATGAAGTATGCCCCAGTGGTATGGAACCTGGATGCTGAC
 BR GTGCACACTTAGGCAATTTTGCATGAAGTATGCCCCAGTGGTATGGAACCTGGATGCTGAC
 UDI GTGCACGCTTAGGCAATTTTGCATGAAGTATGCCCCAGTGGTATGGAACCTGGATGCTGAC
 P21 GTGCACACTTAGGCAATTTTGCATGAAGTATGCCCCAGTGGTATGGAACCTGGATGCTGAC
 P22 GTGCACACTTAGGCAATTTTGCATGAAGTATGCCCCAGTGGTATGGAACCTGGATGCTGAC
 X88783. GTGCACACTTAGGCAATTTTGCATGAAGTATGCCCCAGTGGTATGGAACCTGGATGCTGAC
 CAN GTGCACACTTAGGCAATTTTGCATGAAGTATGCCCCAGTGGTATGGAACCTGGATGCTGAC
 AJ505748. GTGCACACTTAGGCAATTTTGCATGAAGTATGCCCCAGTGGTATGGAACCTGGATGCTGAC
 AF534912 GTGCACACTTAGGCAATTTTGCATGAAGTATGCCCCAGTGGTATGGAACCTGGATGCTGAC
 M38480 GTGCACACTTAGGCAATTTTGCATGAAGTATGCCCCAGTGGTATGGAACCTGGATGCTGAC
 E01310 GTGCACACTTAGGCAATTTTGCATGAAGTATGCCCCAGTGGTATGGAACCTGGATGCTGAC
 NC_001455. GTGCACACTTAGGCAATTTTGCATGAAGTATGCCCCAGTGGTATGGAACCTGGATGCTGAC
 M38655. GTGCACACTTAGGCAATTTTGCATGAAGTATGCCCCAGTGGTATGGAACCTGGATGCTGAC
 AF202462. GTGCACACTTAGGCAATTTTGCATGAAGTATGCCCCAGTGGTATGGAACCTGGATGCTGAC
 AF260641 GTGCACACTTAGGCAATTTTGCATGAAGTATGCCCCAGTGGTATGGAACCTGGATGCTGAC
 AF260640. GTGCACACTTAGGCAATTTTGCATGAAGTATGCCCCAGTGGTATGGAACCTGGATGCTGAC
 X88788. GTGCACACTTAGGCAATTTTGCATGAAGTATGCCCCAGTGGTATGGAACCTGGATGCTGAC
 NR GTGCACACTTAGGCAATTTTGCATGAAGTATGCCCCAGTGGTATGGAACCTGGATGCTGAC
 VEL GTGCACACTTAGGCAATTTTGCATGAAGTATGCCCCAGTGGTATGGAACCTGGATGCTGAC
 UF GTGCACACTTAGGCAATTTTGCATGAAGTATGCCCCAGTGGTATGGAACCTGGATGCTGAC
 LAV GTGCACACTTAGGCAATTTTGCATGAAGTATGCCCCAGTGGTATGGAACCTGGATGCTGAC
 Z29335. GTGCACACTTAGGCAATTTTGCATGAAGTATGCCCCAGTGGTATGGAACCTGGATGCTGAC
 PVXK3 GTGCACACTTAGGCAATTTTGCATGAAGTATGCCCCAGTGGTATGGAACCTGGATGCTGAC
 D87962. GTGCACACTTAGGCAATTTTGCATGAAGTATGCCCCAGTGGTATGGAACCTGGATGCTGAC
 AF272736 GTGCACACTTAGGCAATTTTGCATGAAGTATGCCCCAGTGGTATGGAACCTGGATGCTGAC
 X88784 GTGCACACTTAGGCAATTTTGCATGAAGTATGCCCCAGTGGTATGGAACCTGGATGCTGAC
 PVXCP4 GTGCACACTTAGGCAATTTTGCATGAAGTATGCCCCAGTGGTATGGAACCTGGATGCTGAC
 PVX GTGCACACTTAGGCAATTTTGCATGAAGTATGCCCCAGTGGTATGGAACCTGGATGCTGAC
 PVXHB GTGCACACTTAGGCAATTTTGCATGAAGTATGCCCCAGTGGTATGGAACCTGGATGCTGAC
 *** * ** ** ** ** ***** ** ** ** ** ***** ** ** ** * * * * *

"..Continua.."

FIGURA 3A. "CONT. "

6128
 6069
 VIC TAAACAACAGTCCACCTGCTAACTGGCAAGCACAAGGTTTTCAAGCCTGAGCATATAAATTCGC
 SJ TAAACAACAGTCCACCTGCTAACTGGCAAGCACAAGGTTTTCAAGCCTGAGCATATAAATTCGC
 BR TAAACAACAGTCCACCTGCTAACTGGCAAGCACAAGGTTTTCAAGCCTGAGCACAAAATTCGC
 UDI TAAACAACAGTCCACCTGCTAAATGGCAAGCACAAGGTTTTCAAGCCTGAGCATATAAATTCGC
 P21 TAAACAACAGTCCACCTGCAACTGGCAAGCACAAGGTTTTCAAGCCTGAGCACAAAATTCGC
 P22 TAAACAACAGTCCACCTGCAACTGGCAAGCACAAGGTTTTCAAGCCTGAGCACAAAATTCGC
 X88783. TAAACAACAGTCCACCTGCTAACTGGCAAGCACAAGGTTTTCAAGCCTGAGCACAAAATTCGC
 CAN TAAACAACAGTCCACCTGCTAACTGGCAAGCACAAGGTTTTCAAGCCTGAGCACAAAATTCGC
 AJ505748. TAAACAACAGTCCACCTGCTAACTGGCAAGCACAAGGTTTTCAAGCCTGAGCACAAAATTCGC
 AF534912 TAAACAACAGTCCACCTGCTAACTGGCAAGCACAAGGTTTTCAAGCCTGAGCACAAAATTCGC
 M38480 TAAACAACAGTCCACCTGCTAACTGGCAAGCGCCHAGGTTTTCAAGCCTGAGCACAAAATTCGC
 E01310 TAAACAACAGTCCACCTGCTAACTGGCAAGCGCAAGGTTTTCAAGCCTGAGCACAAAATTCGC
 NC_001455. TAAACAACAGTCCACCTGCTAACTGGCAAGCGCAAGGTTTTCAAGCCTGAGCACAAAATTCGC
 M38655. TAAACAACAGTCCACCTGCTAACTGGCAAGCACAAGGTTTTCAAGCCTGAGCACAAAATTCGC
 AF202462. TAAACAACAGTCCACCTGCTAACTGGCAAGCACAAGGTTTTCAAGCCTGAGCACAAAATTCGC
 AF260641 TAAACAACAGTCCACCTGCTAACTGGCAAGCACAAGGTTTTCAAGCCTGAGCATATAAATTCGC
 AF260640. TAAACAACAGTCCACCTGCTAACTGGCAAGCACAAGGTTTTCAAGCCTGAGCATATAAATTCGC
 X88788. TAAACAACAGTCCACCTGCTAACTGGCAAGCACAAGGTTTTCAAGCCTGAGCACAAAATTCGC
 NR TAAACAACAGTCCACCTGCTAACTGGCAAGCACAAGGTTTTCAAGCCTGAGCACAAAATTCGC
 VEL TAAACAACAGTCCACCTGCTAACTGGCAAGCACAAGGTTTTCAAGCCTGAGCACAAAATTCGC
 UF TAAACAACAGTCCACCTGCTAACTGGCAAGCACAAGGTTTTCAAGCCTGAGCACAAAATTCGC
 LAV TAAACAACAGTCCACCTGCTAACTGGCAAGCACAAGGTTTTCAAGCCTGAGCACAAAATTCGC
 Z29335. TAAACAACAGTCCACCTGCTAACTGGCAAGCACAAGGTTTTCAAGCCTGAGCACAAAATTCGC
 PVX3 TAAACAACAGTCCACCTGCTAACTGGCAAGCACAAGGTTTTCAAGCCTGAGCACAAAATTCGC
 D87962. TAAACAACAGTCCACCTGCTAACTGGCAAGCACAAGGTTTTCAAGCCTGAGCACAAAATTCGC
 AF272736 TAAACAACAGTCCACCTGCTAACTGGCAAGCACAAGGTTTTCAAGCCTGAGCACAAAATTCGC
 X88784 TAAACAACAGTCCGCGCTGCTAACTGGCAAGCGCAAGGTTTTCAAGCCTGAGCACAAAATTCGC
 PVXCP4 AAAACAACAGCCGCGCAACTGGCAGGCACAAGGTTTTCAAGCCGGGACAAAATTCGC
 PVX AAAACAACAGCCACCGGCCAACTGGCAGGCACAAGGTTTTCAAGCCGGGACAAAATTCGC
 PVXHB AAAACAACAGCCACCCAGCCAAATGGCAAGCACAAGGTTTTCAAGCCGGGACAAAATTCGC
 ***** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** * * * * *
 * * * * * ** ** ** * * * * *
 * * * * * ** ** ** * * * * *
 * * * * * ** ** ** * * * * *

"...Continua..."

FIGURA 3A. "CONT."

	6189	6248
VIC	CATCCGGCCACCGTCTGAAGCTGAAATGAATGCTGCCCAAACCTGCTGCCTTTGTGAAGAT	
SJ	CATCCGGCCACCGTCTGAAGCTGAAATGAATGCTGCCCAAACCTGCTGCCTTTGTGAAGAT	
BR	CATCCGGCCACCGTCTGAAGCTGAAATGAATGCTGCCCAAACCTGCTGCCTTTGTGAAGAT	
UDI	CATCCGGCCACCGTCTGAAGCTGAAATCAATGCTGCCCATACTGCTGCCTTTGTGAATAT	
P21	CATCCGGCCACCGTCTGAAGCTGAAATGAATGCTGCCCAAACCTGCTGCCTTTGTGAAAT	
P22	CATCCGGCCACCGTCTGAAGCTGAAATGAATGCTGCCCAAACCTGCTGCCTTTGTGAAGAT	
X88783.	CATCCGGCCACCGTCTGAAGCTGAAATGAATGCTGCCCAAACCTGCTGCCTTTGTGAAGAT	
CAN	CATCCGGCCACCGTCTGAAGCTGAAATGAATGCTGCCCAAACCTGCTGCCTTTGTGAAGAT	
AJ505748.	CATCCGGCCACCGTCTGAAGCTGAGATGAATGCTGCCCAAACCTGCTGCCTTTGTGAAGAT	
AF534912	CATCCGGCCACCGTCTGAAGCTGAAATGAATGCTGCCCAAACCTGCTGCCTTTGTGAAGAT	
M38480	CATTCCGGCCACCGTCTGAAGCTGAAATGAATGCTGCCCAAACCTGCTGCCTTTGTGAAGAT	
E01310	CATTCCGGCCACCGTCTGAAGCTGAAATGAATGCTGCCCAAACCTGCTGCCTTTGTGAAGAT	
NC 001455.	CATTCCGGCCACCGTCTGAAGCTGAAATGAATGCTGCCCAAACCTGCTGCCTTTGTGAAGAT	
M38655.	CATTCCGGCCACCGTCTGAAGCTGAAATGAATGCTGCCCAAACCTGCTGCCTTTGTGAAGAT	
AF202462.	CATCCGGCCACCGTCTGAAGCTGAAATGAATGCTGCCCAAACCTGCTGCCTTTGTGAAGAT	
AF260641	CATCCGGCCACCGTCTGAAGCTGAAATGAATGCTGCCCAAACCTGCTGCCTTTGTGAAGAT	
AF260640.	CATCCGGCCACCGTCTGAAGCTGAAATGAATGCTGCCCAAACCTGCTGCCTTTGTGAAGAT	
X88788.	CATCCGGCCACCATCTGAAGCAGAAATGAATGCTGCCCAAACCTGCTGCCTTTGTGAAGAT	
NR	CATCCGGCCACCGTCTGAAGCTGAAATGAATGCTGCCCAAACCTGCTGCCTTTGTGAAGAT	
VEL	CATCCGGCCACCGTCTGAAGCTGAAATGAATGCTGCCCAAACCTGCTGCCTTTGTGAAGAT	
UF	CATCCGGCCACCGTCTGAAGCTGAAATGAATGCTGCCCAAACCTGCTGCCTTTGTGAAGAT	
LAV	CATCCGGCCACCGTCTGAAGCTGAAATGAATGCTGCCCAAACCTGCTGCCTTTGTGAAGAT	
Z29335.	CATCCGGCCACCGTCTGAAGCTGAAATGAATGCTGCCCAAACCTGCTGCCTTTGTGAAGAT	
PVXX3	CATCCGGCCACCGTCTGAAGCTGAAATGAATGCTGCCCAAACCTGCTGCCTTTGTGAAGAT	
D87962.	TATCCGGCCACCGTCTGAAGCTGAAATGAATGCTGCCCAAACCTGCTGCCTTTGTGAAGAT	
AF272736	CATCCGGCCACCGTCTGAAGCTGAAATGAATGCTGCCCAAACCTGCTGCCTTTGTGAAGAT	
X88784	CATCCGGCCACCGTCTGAAGCTGAGATGAATGCTGCCCAAACCTGCTGCCTTTGTGAAGAT	
PVXCP4	CATGA-----CCGTCTGAAGCAGAAATGAATGCCGCCCAAACCTGCTGCCTTTGTGAAGAT	
PVX	CATGAGACCTCCGTCTGAAGCAGAAATGAATGCCGCCCAAACCTGCTGCCTTTGTGAAGAT	
PVXHB	CATAAGGCCCTCCGTCTGAGGCAGAGATGAATGCCGCTCAAACCTGCTGCCTTTGTGAAGAT	
	** * * * * ** *	

95

"...Continua..."

FIGURA 3A. "CONT."

6249
 6308
 VIC TACAAGGCCAGGGCGCAATCCAACGACTTTGCCAGCCTAGATGCAGCTGTCACTCGAGG
 SJ TACAAGGCCAGGGCGCAATCCAACGACTTTGCCAGCCTAGATGCAGCTGTCACTCGAGG
 BR TACAAGGCCAGGGCGCAATCCAACGACTTTGCCAGCCTAGATGCAGCTGTCACTCGAGG
 UDI TACAAGGCCAGGGCACAAATCCAACGACTTTGCCAGCCTAGATGCAGCTGTCACTCGAGG
 P21 TACTAAGGCCAGGCACCAATCCAACGACTTTGCCGCCCTTGATCCAGCTGTCACTCCAGG
 P22 TACTAAGGCCAGGGCACAAATCCAACGACTTTGCCAGCCTAGATGCAGCTGTCACTCGAGG
 X88783. TACTAAGGCCAGGGCACAAATCCAACGACTTTGCCAGCCTAGATGCAGCTGTCACTCGAGG
 CAN TACAAGGCCAGGGCACAAATCCAACGACTTTGCCAGCCTAGATGCAGCTGTCACTCGAAG
 AJ505748. TACAAGGCCAGGGCACAAATCCAACGACTTTGCCAGCCTAGATGCAGCTGTCACTCGAGG
 AF534912 TACGAAGGCCAGGGCACAAATCCAACGACTTTGCCAGCCTAGATGCAGCTGTCACTCGAGG
 M38480 TACAAGGCCAGGGCACAAATCCAACGACTTTGCCAGCCTAGATGCAGCTGTCACTCGAGG
 E01310 TACAAGGCCAGGGCACAAATCCAACGACTTTGCCAGCCTAGATGCAGCTGTCACTCGAGG
 NC_001455. TACAAGGCCAGGGCACAAATCCAACGACTTTGCCAGCCTAGATGCAGCTGTCACTCGAGG
 M38655. TACAAGGCCAGGGCACAAATCCAACGACTTTGCCAGCCTAGATGCAGCTGTCACTCGAGG
 AF202462. TACGAAGGCCAGGGCACAAATCCAACGACTTTGCCAGCCTAGATGCAGCTGTCACTCGAGG
 AF260641 TACAAGGCCAGGGCACAAATCCAACGACTTTGCCAGCCTAGATGCAGCTGTCACTCGAGG
 AF260640. TACAAGGCCAGGGCACAAATCCAACGACTTTGCCAGCCTAGATGCAGCTGTCACTCGAGG
 X88788. TACGAAGGCCAGGGCACAAATCCAACGACTTTGCCAGCCTAGATGCAGCTGTCACTCGAGG
 NR TACAAGGCCAGGGCACAAATCCAACGACTTTGCCAGCCTAGATGCAGCTGTCACTCGAGA
 VEL TACAAGGCCAGGGCACAAATCCAACGACTTTGCCAGCCTAGATGCAGCTGTCACTCGAGG
 UF TACAAGGCCAGGGCACAAATCCAACGACTTTGCCAGCCTAGATGCAGCTGTCACTCGAGG
 LAV TACGAAGGCCAGGGCACAAATCCAACGACTTTGCCAGCCTAGATGCAGCTGTCACTCGAGG
 Z29335. TACAAGGCCAGGGCACAAATCCAACGACTTTGCCAGCCTAGATGCAGCTGTCACTCGAGG
 FVX33 FVX33 TACAAGGCCAGGGCACAAATCCAACGACTTTGCCAGCCTAGATGCAGCTGTCACTCGAGG
 D87962. TACGAAGGCCAGGGCACAAATCCAACGACTTTGCCAGCCTAGATGCAGCTGTCACTCGAGG
 AF272736 TACAAGGCCAGGGCACAAATCCAACGACTTTGCCAGCCTAGATGCAGCTGTCACTCGAGG
 X88784 TACAAGGCCAGGGCACAAATCCAACGACTTTGCCAGCCTAGATGCAGCTGTCACTCGAGG
 FVXCP4 CACCAAGGCCAGGGCGGCAATCCAACGACTTTGCCAGCTGTGGATCGCGGCTCACTAGGGG
 FVX CACCAAGGCCAGGGCGGCAATCCAACGACTTTGGACAGTCTGGATGCCGGTCACTAGGGG
 FVXHB CACTAAGGCCAGGGCGGCAATCCAACGACTTTGCCAGCTGTGGATGCCGGTCACTAGAGG
 ** ***** *** ***** ***** * ** * ** * ** *****
 " ... Continua... "

FIGURA 4A. "CONT."

121

180

AF260641 C T L R Q F C M K Y A P V V W N W M L T N N S P P A N W Q A Q G F K P E H K F A A F D F F N G V T N P A A I M P K E G L
 AF260640 C T L R Q F C M K Y A P V V W N W M L T N N S P P A N W Q A Q G F K P E H K F A A F D F F N G V T N P A A I M P K E G L
 X88788 C T L R Q F C M K Y A P V V W N W M L T N N S P P A N W Q A Q G F K P E H K F A A F D F F N G V T N P A A I M P K E G L
 Z29335 C T L R Q F C M K Y A P V V W N W M L T N N S P P A N W Q A Q G F K P E H K F A A F D F F N G V T N P A A I M P K E G L
 NR C T L R Q F C M K Y A P V V W N W M L T N N S P P A N W Q A Q G F K P E H K F A A F D F F N G V T N P A A I M P K E G L
 CAN C T L R Q F C M K Y A P V V W N W M L T N N S P P A N W Q A Q G F K P E H K F A A F D F F N G V T N P A A I M P K E G L
 AF272736 C T L R Q F C M K Y A P V V W N W M L T N N S P P A N W Q A Q G F K P E H K F A A F D F F N G V T N P A A I M P K E G L
 X88784 C T L R Q F C M K Y A P V V W N W M L T N N S P P A N W Q A Q G F K P E H K F A A F D F F N G V T N P A A I M P K E G L
 AJ505748 C T L R Q F C M K Y A P V V W N W M L T N N S P P A N W Q A Q G F K P E H K F A A F D F F N G V T N P A A I M P K E G L
 AF202462 C T L R Q F C M K Y A P V V W N W M L T N N S P P A N W Q A Q G F K P E H K F A A F D F F N G V T N P A A I M P K E G L
 VEL C T L R Q F C M K Y A P V V W N W M L T N N S P P A N W Q A Q G F K P E H K F A A F D F F N G V T N P A A I M P K E G L
 P22 C T L R Q F C M K Y A P V V W N W M L T N N S P P A N W Q A Q G F K P E H K F A A F D F F N G V T N P A A I M P K E G L
 BR C T L R Q F C M K Y A P V V W N W M L T N N S P P A N W Q A Q G F K P E H K F A A F D F F N G V T N P A A I M P K E G L
 UF C T L R Q F C M K Y A P V V W N W M L T N N S P P A N W Q A Q G F K P E H K F A A F D F F N G V T N P A A I M P K E G L
 X88783 C T L R Q F C M K Y A P V V W N W M L T N N S P P A N W Q A Q G F K P E H K F A A F D F F N G V T N P A A I M P K E G L
 AF534912 C I L R Q F C M K Y A P V V W N W M L T N N S P P A N W Q A Q G F K P E H K F A A F D F F N G V T N P A A I M P K E G L
 D87962 C T L R Q F C M K Y A P V V W N W M L T N N S P P A N W Q A Q G F K P E H K F A A F D F F N G V T N P A A I M P K E G L
 LAV C T L R Q F C M K Y A P V V W N W M L T N N S P P A N W Q A Q G F K P E H K F A A F D F F N G V T N P A A I M P K E G L
 P V X 3 C T L R Q F C M K Y A P V V W N W M L T N N S P P A N W Q A Q G F K P E H K F A A F D F F N G V T N P A A I M P K E G L
 V I C C T L R Q F C M K Y A P V V W N W M L T N N S P P A N W Q A Q G F K P E H K F A A F D F F N G V T N P A A I M P K E G L
 P 2 1 C T L R Q F C M K Y A P V V W N W M L T N N S P P A N W Q A Q G F K P E H K F A A F D F F N G V T N P A A I M P K E G L
 U D I C T L R Q F C M K Y A P V V W N W M L T N N S P P A K W A Q G F K P E H K F A A F D F F H G V T N P A A I M P K E G L
 M38655 C T L R Q F C M K Y A P V V W N W M L S N N S P P A N W Q A Q G F K P E H K F A A F D F F N G V T N P A A I M P K E G L
 E01310 C T L R Q F C M K Y A P V V W N W M L T N N S P P A N W Q A Q G F K P E H K F A A F D F F N G V T N P A A I M P K E G L
 M38480 C T L R Q F C M K Y A P V V W N W M L T N N S P P A N W Q A Q G F K P E H K F A A F D F F N G V T N P A A I M P K E G L
 NC_001455 C T L R Q F C M K Y A P V V W N W M L T N N S P P A N W Q A Q G F K P E H K F A A F D F F N G V T N P A A I M P K E G L
 S J C T L R Q F C M K Y A P V V W N W M L T N N S P P A N W Q A Q G F K P E H K F A A F D F F N G V T N P A A I M P K E G L
 P V X c p 4 C K L R Q F C R K Y A P V V W N W M L T N N S P P A N W Q A Q G F K P E H K F A A F D F F D G V T N P A A I T P K E G L
 P V X H B C K L R Q F C R K Y A P V V W N W M L T N N S P P A N W Q A Q G F K P E H K F A A F D F F D G V T N P A A I T P K E G L
 P V X c p C T L R Q F C K K Y A P V V W N W M L T N N S P P A N W Q A Q G F K P E N K F A A F D F F D G V T N P A A I T P K E G L
 ***** **;*****:***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** *****

"..Continua.."

FIGURA 4A. "CONT."

181 237
AF260641 IRPPEAEMNAAQTAA FVKITKARQSNDFASLDAAVTRGRITGTTTAEAVVTLPPP
AF260640 IRPPEAEMNAAQTAA FVKITKARQSNDFASLDAAVTRGRITGTTTAEAVVTLPPP
X88788 IRPPEAEMNAAQTAA FVKITKARQSNDFASLDAAVTRGRITGTTTAEAVVTLPPP
Z29335 IRPPEAEMNAAQTAA FVKITKARQSNDFASLDAAVTRGRITGTTTAEAVVTLPPP
NR IRPPEAEMNAAQTAA FVKITKARQSNDFASLDAAVTRDRITGTTTAEAVVTLPPP
CAN IRPPEAEMNAAQTAA FVKITKARQSNDFASLDAAVTRSRITGTTTAEAVVTLPPP
AF272736 IRPPEAEMNAAQTAA FVKITKARQSNDFASLDAAVTRGRITGTTTAEAVVTLPPP
X88784 IRPPEAEMNAAQTAA FVKITKARQSNDFASLDAAVTRGRITGTTTAEAVVTLPPP
AJ505748 IRPPEAEMNAAQTAA FVKITKARQSNDFASLDAAVTRGRITGTTTAEAVVTLPPP
AF202462 IRPPEAEMNAAQTAA FVKITKARQSNDFASLDAAVTRGRITGTTTAEAVVTLPPP
VEL IRPPEAEMNAAQTAA FVKITKARQSNDFASLDAAVTRGRITGTTTAEAVVTLPPP
P22 IRPPEAEMNAAQTAA FVKITKARQSNDFASLDAAVTRGRITGTTTAEAVVTLPPP
BR IRPPEAEMNAAQTAA FVKITKARQSNDFASLDAAVTRGRITGTTTAEAVVTLPPP
UF IRPPEAEMNAAQTAA FVKITKARQSNDFASLDAAVTRGRITGTTTAEAVVTLPPP
X88783 IRPPEAEMNAAQTAA FVKITKARQSNDFASLDAAVTRGRITGTTTAEAVVTLPPP
AF534912 IRPPEAEMNAAQTAA FVKITKARQSNDFASLDAAVTRGRITGTTTAEAVVTLPPP
D87962 IRPPEAEMNAAQTAA FVKITKARQSNDFASLDAAVTRGRITGTTTAEAVVTLPPP
LAV IRPPEAEMNAAQTAA FVKITKARQSNDFASLDAAVTRGRITGTTTAEAVVTLPPP
PVX3 IRPPEAEMNAAQTAA FVKITKARQSNDFASLDAAVTRGRITGTTTAEAVVTLPPP
VIC IRPPEAEMNAAQTAA FVKITKARQSNDFASLDAAVTRGRITGTTTAEAVVTLPPP
P21 IRPPEAEMNAAQTAA FVKITKARQSNDFASLDAAVTRGRITGTTTAEAVVTLPPP
UDI IRPPEAEMNAAQTAA FVKITKARQSNDFASLDAAVTRGRITGTTTAEAVVTLPPP
M38655 IRPPEAEMNAAQTAA FVKITKARQSNDFASLDAAVTRGRITGTTTAEAVVTLPPP
E01310 IRPPEAEMNAAQTAA FVKITKARQSNDFASLDAAVTRGRITGTTTAEAVVTLPPP
M38480 IRPPEAEMNAAQTAA FVKITKARQSNDFASLDAAVTRGRITGTTTAEAVVTLPPP
NC_001455 IRPPEAEMNAAQTAA FVKITKARQSNDFASLDAAVTRGRITGTTTAEAVVTLPPP
SJ IRPPEAEMNAAQTAA FVKITKARQSNDFASLDAAVTRGRITGTTTAEAVVTLPPP
PVXcp4 IRPPEAEMNAAQTAA FVKITKARQSNDFASLDAAVTRGRITGTTTAEAVVTLPPP
PVXHB IRPPEAEMNAAQTAA FVKITKARQSNDFASLDAAVTRGRITGTTTAEAVVTLPPP
PVXcp MRPPEAEMNAAQTAA FVKITKARQSNDFASLDAAVTRGRITGTTTAEAVVTLPPP
:*** ***:****:*****:**** ***:****:*****:**** ***:****:*****:****