



UNIVERSIDADE FEDERAL DE LAVRAS

**CARACTERIZAÇÃO DE ISOLADOS DO  
VÍRUS Y (“*Potato Virus Y*” - PVY),  
PROVENIENTES DE BATATA NO BRASIL**

**FLÁVIO HENRIQUE REIS MORAES**

**2003**

**FLÁVIO HENRIQUE REIS MORAES**

**CARACTERIZAÇÃO DE ISOLADOS DO VÍRUS Y  
("Potato Virus Y" - PVY), PROVENIENTES DE BATATA  
NO BRASIL**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Curso de Doutorado 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

Moraes, Flávio Henrique Reis

Caracterização de isolados do vírus Y ("*Potato virus Y*" – PVY), provenientes de batata no Brasil / Flávio Henrique Reis Moraes. -- Lavras : UFLA, 2003.  
124 p. : il.

Orientador: Antonia dos Reis Figueira.

Tese (Doutorado) – UFLA.

Bibliografia.

1. Batata – *Solanum tuberosum* – Doença. 2. Vírus Y da batata - Estirpe. 3. Diagnóstico. 4. Teste biológico – Planta indicadora. 5. Teste sorológico – DAS ELISA. 6. Anticorpo monoclonal e policlonal. 7. Teste Dialelo Parcial. 8. Técnica molecular: RT-PCR – Clonagem – Sequenciamento. 9. Análise filogenética – 5'NTR, N-terminal P1 e CP. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD-635.2198

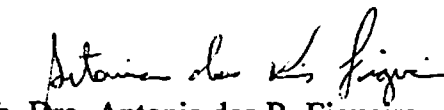
**FLÁVIO HENRIQUE REIS MORAES**

**CARACTERIZAÇÃO DE ISOLADOS DO VÍRUS Y  
("Potato Virus Y" - PVY), PROVENIENTES DE BATATA  
NO BRASIL**

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

Aprovada em 28 de fevereiro de 2003

Prof. Dr. Francisco Murilo Zerbini	UFV
Prof. Dr. Ricardo Magela de Souza	UFLA
Prof. Dr. José da Cruz Machado	UFLA
Prof. Dr. José Donizeti Alves	UFLA

  
Prof. Dra. Antonia dos R. Figueira  
Depto. Fitopatologia / UFLA  
(Orientadora)

**LAVRAS  
MINAS GERAIS – BRASIL**

**A DEUS** pela dádiva da vida.

**Aos meus pais, Felipe e Lourdes, por tudo.**

**Aos meus irmãos Fábio e Felipe Jr.**

**Às minhas irmãs Fabiane e Fabíola.**

**À gente humilde da minha região, Nordeste.**

### **OFEREÇO E DEDICO**

“Quando você mantém um sentimento de compaixão, bondade e amor, algo abre automaticamente sua porta interna. Com isso, você pode se comunicar mais facilmente com as outras pessoas. E esse sentimento de calor cria uma espécie de abertura. Você descobre que todos os seres humanos são exatamente iguais a você e se torna capaz de se relacionar mais facilmente com eles. Isso lhe confere um espírito de amizade. Então há menos necessidade de esconder as coisas e, conseqüentemente, sentimentos de medo, dúvida e insegurança se dispersam.”

Do livro **A ARTE DA FELICIDADE**.  
(Dalai Lama e Howard C. Cutler, 2000)

**Ao AMOR** verdadeiro, pois sem ele tudo se torna banal.

**À PAZ**, pois sem ela o resto se torna caos.

**À FELICIDADE**, pois sem ela o resto se torna triste.

**À SAÚDE**, pois sem ela tudo citado acima se torna inalcançável.

**A VIDA** e a tudo de belo que nela exista.

**Flávio (04/2003)**

## AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Lavras pela oportunidade de realizar o curso de Doutorado em Fitopatologia.

Ao Departamento de Fitopatologia pelo apoio no trabalho de pesquisa.

À CAPES pela concessão da bolsa de estudo.

À Professora Antonia dos Reis Figueira pela orientação.

À Dra. Alessandra de Jesus Boari pela co-orientação e sugestões imprescindíveis para realização desse trabalho.

Aos demais Professores, funcionários e colegas do Departamento de Fitopatologia - UFLA.

A Catinha pelo grande carinho e ensinamentos quanto ao AMOR verdadeiro.

Ao casal de amigos, Márcio (Manga) e Cássia, pelo apoio prestado, convívio e exemplo de profissionalismo.

Aos grandes amigos, Gleiber (gatinho), Andrei, Gordo, Pedro, Cássio e Henrique (*In memoriam*), e às amigas Ellen e Lucinha, pelos momentos de alegria e tristeza, convívios e compartilhados, e pelo grande incentivo e exemplo de vida.

Aos amigos (as) do Centro de Indexação de Vírus de Minas Gerais: Denize, Carlos, Antônio Carlos e Sérgio, pelo total apoio na realização desse trabalho.

A todos que colaboraram de alguma maneira para a execução desse trabalho.



## SUMÁRIO

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS.....	i
RESUMO.....	ii
ABSTRACT.....	iv
<b>CAPÍTULO 1</b> .....	1
1 INTRODUÇÃO GERAL.....	2
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	4
2.1 Batata: importância e principais doenças viróticas.....	4
2.2 PVY: Classificação e Caracterização da partícula.....	5
2.3 PVY: hospedeiras e estirpes.....	6
2.4 PVY: ocorrência e variabilidade no Brasil e no mundo.....	8
2.5 PVY: Caracterização, identificação e classificação de isolados de batata.....	14
2.5.1 Caracterização Biológica e Sorológica.....	15
2.5.2 Caracterização Molecular.....	18
3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	21
<b>CAPÍTULO 2: Comparação biológica e sorológica de isolados do <i>Potato Virus Y</i> (PVY) e análise de dialelos parciais empregando 17 cultivares de batata</b> .....	34
1 RESUMO.....	35
2 ABSTRACT.....	36
3 INTRODUÇÃO.....	37
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	40
4.1 Obtenção, purificação e armazenamento dos isolados de PVY.....	40
4.2 Teste de gama de hospedeiras.....	41

4.3 Teste sorológico DAS-Elisa utilizando anti-soros policlonal (PVY) e monoclonal (PVY <sup>N</sup> ).....	42
4.4 Teste de Dialelo parcial.....	43
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>45</b>
5.1 Propriedades biológicas e sorológica dos isolados de PVY.....	45
5.2 Sintomas em cultivares de batata.....	53
5.3 Análise de Dialelo Parcial.....	55
5.4 Avaliação dos tubérculos progênes.....	59
<b>6 CONCLUSÕES.....</b>	<b>60</b>
<b>7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>61</b>
<b>CAPÍTULO 3: Estudo molecular nas regiões: 5'NTR, N-terminal P1, últimos 23aa. da C-terminal N1b, e N-terminal CP entre oito isolados de PVY.....</b>	<b>65</b>
1 RESUMO.....	66
2 ABSTRACT.....	67
3 INTRODUÇÃO.....	68
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	71
4.1 Obtenção e manutenção dos isolados de PVY.....	71
4.2 Purificação parcial do PVY e extração do RNA.....	72
4.3 Transcrição reversa e PCR.....	73
4.4 Clonagem e Seqüenciamento.....	74
4.5 Análises das seqüências.....	74
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>75</b>
5.1 Comparação das regiões 5'NTR e os primeiros 98aa. da N-terminal P1, entre os isolados estudados e com outros já publicados.....	75
5.1.2 Comparação da seqüência de nucleotídeos na região 5'NTR.....	76
5.1.3 Comparação da seqüência de aminoácidos na região N-terminal P1.....	83



5.2. Comparação dos últimos 23aa. da região C-terminal Nib e 158aa. da N-terminal da proteína da capa (CP) entre os isolados estudados e com outros já publicados.....	88
5.2.1 Comparação dos últimos 23aa. da região C-terminal da proteína Nib....	89
5.2.2 Comparação da região N-terminal CP (primeiros 158aa.).....	93
5.2.3 Comparação entre seqüências de aminoácidos na região N-terminal da proteína da capa.....	96
5.3 Evidência de possível recombinação gênica (Características biológicas X moleculares).....	104
6 CONCLUSÕES.....	107
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	108
ANEXOS.....	115

## RESUMO

MORAES, Flávio Henrique Reis. **Caracterização de isolados do vírus Y ("Potato Virus Y" - PVY) provenientes de batata no Brasil. 2003. 124p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.**<sup>1</sup>

Neste trabalho 20 isolados de PVY (11 PVY<sup>N</sup> e 09 PVY<sup>O</sup>) detectados em tubérculos de batata (*Solanum tuberosum*), provenientes de diferentes regiões produtoras do Brasil, foram inicialmente caracterizados quanto às suas propriedades sorológicas e sintomatologia induzida em 15 espécies de hospedeiras. Posteriormente foram selecionados quatro isolados para análise de dialelos parciais e estudo da sua capacidade de infecção e sintomatologia, em 17 cultivares de batata, e oito isolados para caracterização molecular de regiões específicas nos seus genomas. Todos os isolados foram Elisa positivos quando foram utilizados anticorpos policlonais para PVY. Os sintomas induzidos nas plantas indicadoras, mostraram uma maior variabilidade entre os isolados necróticos do que entre os comuns, sendo que apenas o YO-07Mg induziu sintomas ligeiramente diferente dos outros isolados comuns. Com base na sintomatologia em fumo (*Nicotiana tabacum*) cvs. Turkish, Turkish NN (TNN) e Havana, *N. glutinosa*, *N. rustica* e *P. floridana*, os isolados necróticos foram divididos em três grupos: grupo I, constituído por Br-Mg, Br2-Mg, 404Sp e 45-5; grupo II, constituído pelo UFLA, Mg1, 21Sp, 22Sp, Velox21 e Cris01; grupo III, com o Cris02. Quatro isolados, que causaram necroses das nervuras em plantas de fumo, quando testados por DAS-ELISA, utilizando anticorpo monoclonal para a PVY<sup>O</sup> (Agdia 26000 e 26001) se comportaram de modo distinto dos outros isolados necróticos, não reagindo ou apresentando reação extremamente fraca. O principal sintoma, observado nas 17 cultivares de batata inoculadas com os quatro isolados de PVY, foi de mosaico, com diferentes intensidades. Algumas cultivares apresentaram lesões necróticas localizadas ou em toda a folha, caracterizando reação hipersensitiva. A análise de dialelos parciais demonstrou variabilidade nas resistências horizontal e vertical das 17 cultivares de batata, sendo que as cultivares Cycloon, Liseta e Fambo apresentaram maior resistência horizontal, e a Achat, Bintje, Felsina e Victoria, a maior resistência vertical, para alguns isolados. Foi demonstrada a variabilidade na agressividade e virulência dos isolados de PVY testados. Os oito isolados de PVY, quatro necróticos e quatro comuns, tiveram as seguintes regiões genômicas seqüenciadas: a 5'NTR e a N-terminal da P1, os últimos 23aa. da C-terminal da N1b e a N-terminal da capa (CP). Essas seqüências foram comparadas entre si e com as de outros isolados já publicados. No alinhamento

---

<sup>1</sup> Comitê de orientação: Antonia dos Reis Figueira (orientadora) e Alessandra de Jesus Boari (co-orientadora).

das regiões 5'NTR e N-terminal da P1, os oito isolados foram divididos em dois grupos. Na região N-terminal da P1, a identidade entre os oito isolados variou de 66% a 98% e na 5'NTR, variou de 60 a 100%. Comparadas com as de outros isolados, as sequências dessas regiões originaram árvores filogenéticas semelhantes, divididas em três grupos. Dois isolados se agruparam de modo atípico: o YO-07Mg, junto com isolados do tipo PVY<sup>NNTN</sup> e o recombinante yN242-Fr, e o YN-UFLA que se agrupou com os isolados típicos PVY<sup>O</sup> e os recombinantes padrão Wilga (ynWi-P e pvynWi) e pvyn-Fr, sugerindo a possibilidade de serem recombinantes. Nos últimos 23aa. da C-terminal da N1b e na região N-terminal da CP, as identidades entre os oito isolados, variaram de 93 a 98%. No alinhamento da região N-terminal da CP, esses se dividiram em quatro subgrupos e quando foram comparados com os outros isolados do banco de genes, o YO299 foi o que mais se distanciou, tendo sido agrupado com isolados provenientes dos Estados Unidos, Canadá e Argentina. Os isolados necróticos mostraram maior variabilidade na região N-terminal da CP, já que foram agrupados juntamente com os isolados pertencentes aos grupos Y<sup>O/C</sup>, os recombinantes Y<sup>N.O</sup> (sorogrupo O,C) e um isolado de pimentão, existindo também a possibilidade desses serem recombinantes. A diversidade observada nesse estudo, sugere que as quatro regiões sequenciadas não estejam correlacionadas com os sintomas induzidos, não sendo assim determinantes de sintomatologia. Este é o primeiro trabalho que faz uma análise detalhada de isolados de PVY, associando propriedades biológicas, sorológicas e moleculares, com a finalidade demonstrar a existência de possíveis recombinantes nos campos de produção de batata no Brasil.

## ABSTRACT

MORAES, Flávio Henrique Reis. **Characterization of *Potato virus Y* (PVY) isolates from potato in Brazil.** 2003. 124p. Thesis (Doctorate program in Phytopathology) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.<sup>1</sup>

In this work, the serological properties and the symptoms induced in 15 species of host plants by 20 isolates of PVY (11 PVY<sup>N</sup> and 09 PVY<sup>O</sup>), detected in potato (*Solanum tuberosum* L.) tubers from different Brazilian potato fields, were investigated. After that, four isolates were chosen to perform a partial diallel analysis and to investigate the symptoms and infectivity in 17 potato cultivars. Eight isolates were also chosen for molecular characterization of specific genomic regions. All the 20 isolates showed positive reaction to PVY policlonal antibodies in DAS-Elisa. The symptoms induced by necrotic isolates in host plants were highly variable whereas among the PVY<sup>O</sup> isolates only PVYO-07Mg showed slight differences. Based on the symptoms of *Nicotiana tabacum* cvs. Turkish, Turkish NN (TNN,) and Havana, *N. glutinosa*, *N. rustica* and *Physalis floridana*, the necrotic isolates was divided in three groups: group I, consisted by Br-Mg, Br2-MG, 404Sp and 45-5; group II consisted by UFLA, Mg1, 21Sp, 22Sp, Velox21 and Cris01; group III with Cris02. Four isolates (YNBr-Mg, YNBr2-Mg, YN404Sp, and YN45-5) induced necrosis in tobacco plants but showed distinct serological properties from the others necrotic isolates. They either did not react or presented a very weak reaction when tested by DAS-ELISA using monoclonal antibodies for PVY<sup>N</sup> (Agdia 26000 and 26001). The main symptoms showed by the 17 potato cultivars consisted of several degrees of mosaic. Some cultivars showed local necrotic lesions and/or hypersensitivity. The analysis of partial diallel demonstrated variability for horizontal and vertical resistances of potato cultivars. Cultivars Clycloon, Liseta and Fambo showed higher horizontal resistance whereas Achat, Bintje, Felsina and Victoria showed higher vertical resistance. High variability of virulence and aggressiveness of PVY isolates was demonstrated. The eight isolates of PVY (four PVY<sup>N</sup> and four PVY<sup>O</sup>) were sequenced in the following genomic regions: 5'NTR and N-terminal of P1 protein, the last 23aa of Nib C-terminal and N-terminal of the capsid protein (CP). The nucleotide and amino acid sequences were compared among themselves and with others published PVY sequences. In the alignment of amino acid and nucleotide sequences from 5'NTR and N-terminal of P1, the eight isolates were divided in two groups. The identity of N-terminal region of P1 amongst the eight isolates ranged from 66 to 98% and in 5'NTR region from 60 to 100%. When compared with others PVY isolates the

---

<sup>1</sup> Guidance Committee: Antonia dos Reis Figueira (Adviser); Alessandra de Jesus Boari (co-adviser).

sequences of both regions generate similar phylogenetic trees which were divided in three groups. Two isolates were located in atypical groups: the YO-07Mg into PVY<sup>N<sup>NTN</sup></sup> group where is also located the yN242Fr recombinant; the YN-UFLA into Wilga patern group (ynWi-P and pvynWi) where is also located pvyn-Fr, suggesting the possibility of being recombinants. The identities of the C-terminal region of N1b and N-terminal region of CP among the eight isolates ranged from 93 to 98%. In the alignment of N-terminal region of CP they were divided in four subgroups and when they were compared with others PVY isolates, the YO299 was grouped separately together with isolates from United States, Canada and Argentina. The necrotic isolates showed higher variability in the N-terminal region of CP. They were grouped together with isolates belonging to PVY<sup>O<sup>C</sup></sup> group, PVY<sup>N<sup>O</sup></sup> recombinants (serogroup O,C) and one pepper isolate, suggesting again the possibility of being recombinants. The diversity verified in this study suggest that this four regions sequenced is not determinant of sintomatology. This is the first work in Brazil which demonstrated the possibility of finding recombinant PVY isolates in the Brazilian potato fields, based on the analysis of its biological, serological and molecular properties.

## CAPÍTULO 1

## 1 INTRODUÇÃO GERAL

A batata (*Solanum tuberosum* L.) tem representado importante papel na nutrição humana, ao longo dos séculos, ocupando atualmente o quarto lugar entre os alimentos mais consumidos no mundo. No Brasil é a principal hortaliça, tanto em área cultivada quanto na preferência alimentar, sendo as regiões Sul e Sudeste as principais produtoras. O estado de Minas Gerais apresenta o maior volume de produção, seguido por São Paulo, Paraná, Rio Grande do Sul e Santa Catarina (Agriannual 2002).

A produção de batata pode ser afetada por fatores bióticos e abióticos, dentre eles se destaca a presença de patógenos em sementes (Hooker, 1981). Os fitovírus se encontram entre os mais importantes, pois podem causar rápida degenerescência dos tubérculos, após remultiplicações em campo. O vírus do enrolamento (*Potato leafroll virus* - PLRV), era considerado o único causador de perdas nessa cultura no Brasil, até meados de 1995, quando um isolado do vírus Y (*Potato virus Y* -PVY), oriundo de sementes importadas da Europa (Figueira & Pinto, 1995), com rápida disseminação em campo, mudou esse quadro e o PVY passou a ser uma das principais causas de condenação e reclassificação da batata-semente nos estados produtores (Figueira et al., 1996; Figueira, 1999).

As estirpes de PVY que infectam a batata, segundo critérios biológicos e sorológicos clássicos (De Bokx & Huttinga, 1981), são: PVY<sup>O</sup> (grupo comum, isolados que causam mosaico em fumo), PVY<sup>C</sup> (elicitam resposta hipersensível em cultivares de batata que possuem o gene *Nc*) e PVY<sup>N</sup> (grupo necrótico, induz necrose das nervuras em fumo), que nos últimos anos tem ocorrido com maior frequência (Weidemann, 1988; Souza Dias, 1996; Figueira, 1999). Entretanto, devido a grande variabilidade existente, alguns isolados de PVY não se enquadram nestes grupos tradicionais (Shukla et al., 1988). Provavelmente uma



das causas dessa variabilidade é o fato de que o PVY apresenta grandes possibilidades de recombinação genética (Revers et al., 1996), influenciando na epidemiologia e determinando a sua sobrevivência em campo.

A identificação desses variantes é de grande importância para o estabelecimento de métodos de controle em campo. Entretanto isso nem sempre é possível, quando se utilizam os testes tradicionais, devido ao seu alto relacionamento bio-sorológico e molecular. O advento das técnicas de Biologia Molecular, como seqüenciamento, facilitou os estudos de caracterização e organização do genoma dos fitovírus, permitindo inclusive a detecção de recombinantes entre estirpes de PVY (Revers et al., 1996; Glais et al., 2002; Moury et al., 2002). Pesquisadores de diversos países produtores de batata têm trabalhado na identificação de seqüências genômicas específicas dos variantes genéticos de PVY com a finalidade de desenhar primers e sondas (Cеровská et al., 2001; Boonham et al., 2002a; Nie & Singh, 2002a; 2002b; Moravec et al., 2003), e anticorpos monoclonais específicos (Cеровská, 1998; Cеровská et al., 1999; Ounouna et al., 2002), permitindo maior precisão e rapidez na diagnose.

O fato de o Brasil ser dependente da importação de sementes de batata básica para remultiplicação no campo faz com que o risco de introdução de novos isolados de vírus seja extremamente alto. Não se sabe exatamente quantos nem quais são os isolados de PVY já presentes em território nacional, pois as sementes aqui plantadas têm sido importadas da Europa, Canadá e Estados Unidos. Visando estabelecer a atual situação das estirpes de PVY existentes no país até o presente momento, nesse trabalho foi realizada a caracterização de isolados de PVY, provenientes de batata de diferentes regiões produtoras do Brasil, através da determinação das suas propriedades biológicas (Gama de hospedeiro e reação em cultivares de batata), sorológicas (DAS-ELISA) e moleculares (seqüenciamento das regiões 5'NTR e N-terminal da proteína P1 e da capa - CP).

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Batata: importância e principais doenças viróticas

A batata (*Solanum tuberosum* L.), originada da América do Sul, além de seu valor nutritivo (rica em amido, proteínas, vitaminas e sais minerais), é também a hortaliça mais consumida no mundo. De acordo com estimativas da FAO a China é o principal produtor, a Holanda o primeiro em exportação e importação e os Estados Unidos e a França líderes em produtividade, atingindo cerca de 39 t/ha. O Brasil detém o 19º lugar em produção mundial (2,7 milhões de toneladas) e, na América do Sul, é o 3º em área plantada (150 mil hectares/ano) e o 5º lugar em produtividade, importando anualmente em torno de 7.000 toneladas de batata-semente de diversos países da Europa e também do Canadá (Agrianual, 2002). O estado de Minas Gerais apresenta uma produtividade média em torno de 22t/ha, sendo o maior produtor nacional, com 870 mil toneladas anuais, seguido pelos estados de São Paulo (720 mil toneladas), Paraná, Rio Grande do Sul e Santa Catarina (Agrianual 2002).

A cultura da batata pode ser afetada por diversas doenças causadas por vírus e uma por viróide (Hooker, 1981). O vírus do enrolamento da folha (*Potato leafroll virus* - PLRV), o vírus Y (*Potato virus Y* - PVY), o vírus X (*Potato virus X* - PVX) e o vírus S (*Potato virus S* - PVS) geralmente são os mais importantes (De Bokx & Huttinga, 1981; Weidmann, 1988; Souza Dias 1995; 1996; Figueira, 1999).

## 2.2 PVY: Classificação e Caracterização da partícula

O mosaico comum da batata, que possui como agente etiológico o PVY, membro tipo do gênero *Potyvirus*, família *Potyviridae*, tem sido considerado, desde 1995, uma das viroses mais importantes no Brasil (Figueira, 1999). O PVY foi descrito pela primeira vez na Inglaterra por Smith em 1931 (citado por De Bokx & Huttinga, 1981; Brunt et al., 1996). No Brasil, existem evidências da sua presença desde os primeiros plantios comerciais de batata (Silberschmidt, 1937; Silberschmidt & Kramer, 1942).

A família *Potyviridae* é a mais numerosa entre os vírus de plantas, contendo cerca de 20% dos vírus descritos, sendo dividida em seis gêneros (*Potyvirus*, *Rymovirus*, *Bymovirus*, *Tritimovirus*, *Ipomovirus* e *Macluravirus*), diferenciados com base no tipo de inseto vetor e no número de componentes do genoma. O gênero *Potyvirus*, constituído por vírus transmitidos por afídeos e que possuem apenas um componente genômico, é o mais numeroso, com 91 espécies, incluindo o PVY (van Regenmortel et al., 2000). Informações adicionais a respeito da família *Potyviridae* podem ser obtidas no livro editado por Shukla et al. (1994) e com as revisões publicadas por Zerbini & Maciel-Zambolim (1999 e 2000).

O PVY pode ser facilmente transmitido por inoculação mecânica e por muitas espécies de afídeos vetores, de forma não-persistente, entretanto o *Myzus persicae* Sulz. tem sido considerado um dos mais importantes (De Bokx, 1981). O ssRNA<sup>+</sup> com cerca de 9,7 kb de tamanho é, encapsulado em partícula filamentososa, flexível, medindo em torno de 730 nm de comprimento por 11 nm de diâmetro com um orifício central em torno de 2-3 nm de diâmetro (De Bokx, 1981; De Bokx & Huttinga, 1981; Hollings & Brunt, 1981) e “pitch” (volta completa da hélice) com cerca de 3,3 a 3,5 nm. O RNA compreende cerca de 5,4-6,4 % do total da massa da partícula (Stace-Smith & Tremaine, 1970), e é coberto por  $\cong$  2.200 cópias da proteína capsidial com peso molecular de 34 kDa.

O genoma viral, covalentemente ligado a uma VPg, no terminal 5' e a uma cauda poly A na extremidade 3', possui uma única unidade codificadora traduzível ("open reading frame"- ORF), cuja tradução origina uma proteína com peso superior a 350 kDa. Essa poliproteína é processada por três proteases contidas em sua própria seqüência (PI, HC-Pro, NIa) (Carrington et al., 1990), originando dez proteínas funcionais (PI, HC-Pro, P3, 6K<sub>1</sub>, CI, 6K<sub>2</sub>, Vpg, NIa-Pro, NIb, CP) com diferentes pesos e diferentes funções, além das regiões 5' e 3' não traduzidas (5'NTR e 3'NTR) (Dougherty & Carrington, 1988; Riechmann et al., 1992; Shukla et al., 1994).

### 2.3 PVY: hospedeiras e estirpes

O PVY infecta natural ou experimentalmente 342 espécies de 69 gêneros, em 27 famílias de plantas (Edwardson et al., 1984), limitando-se praticamente à família *Solanaceae*, podendo infectar experimentalmente alguns membros de *Amaranthaceae*, *Chenopodiaceae*, *Compositae* e *Leguminosae* (De Bokx & Huttinga, 1981). Raramente são encontradas plantas perenes atuando como hospedeiras do PVY na natureza (De Bokx, 1981). Os sintomas induzidos por PVY variam com o genótipo e a idade do hospedeiro, a estirpe e concentração do vírus e fatores ambientais, como temperatura, podendo variar desde infecção latente até necrose pronunciada de folhas e morte das plantas (De Bokx & Piron, 1977; Hooker, 1981; Le Romancer & Nedellec, 1997).

As estirpes do PVY que infectam a cultura da batata segundo critérios biológicos clássicos, têm sido classificadas em três grupos: comum (PVY<sup>O</sup>), que causa mosaico leve em plantas de fumo (*Nicotiana tabacum* L.) e sintomas de mosaico que variam de fracos a severos, em diferentes cultivares de batata, e causa desfolha em *Physalis floridana* (Rybd); necrótica (PVY<sup>N</sup>), que induz necrose nas nervuras de plantas de fumo, sintomas variáveis de mosaico em batata e não provoca desfolha em *Physalis*; e a denominada PVY<sup>C</sup> causa necrose

sistêmica “Sttiple-streak” em cultivares de batata que possuem o gene *Nc* (De Bokx & Huttinga, 1981), e eram consideradas como não transmissíveis por vetor. Entretanto, Blanco-Urgoiti et al. (1998a) verificaram que alguns isolados de PVY<sup>C</sup> possuíam capacidade de serem transmitidos por *M. persicae* e, dividiram este grupo em C1 e C2, de acordo com a sua respectiva capacidade ou não de infectar pimentão cv. Yolo Wonder. Uma variante da estirpe necrótica, denominada de PVY<sup>NTN</sup>, que se diferencia dos demais isolados desse grupo por induzir a formação de anéis necróticos nos tubérculos e pela sua capacidade de infectar pimentão e algumas cultivares de fumo e de tomate (Le Romancer et al., 1994), tem sido descrita em diversos países produtores de batata no mundo (Beczner et al., 1894; Steinbach & Hamann, 1989; Buturovic & Kus, 1990; Le Romancer & Kerlan, 1991; McDonald & Singh, 1993; Chrzanowska, 1995; Serra & Weidemann, 1997; Tomassoli et al., 1998). Existem ainda isolados de PVY não se enquadram nestes grupos tradicionais (Shukla et al., 1988).

O grupo PVY<sup>O</sup> possui distribuição geográfica generalizada, ocorrendo em todos os continentes. O grupo PVY<sup>N</sup> já foi relatado na Europa, América do Sul e América do Norte (Ellis et al., 1997). A distribuição geográfica do grupo PVY<sup>C</sup> parece ser restrita, talvez devido ao fato de alguns desses isolados não são transmitidos por afídeos (Blanco-Urgoiti et al., 1998a) e induzem reação de hipersensibilidade em diversos cultivares de batata, o que pode limitar a sua disseminação (Ellis et al., 1997).

Os isolados de PVY provenientes de outras espécies de solanáceas, como pimentão, pimenta, tomate e fumo, podem algumas vezes induzir sintomas necróticos em *N. tabacum*, similares àqueles induzidos por estirpes do grupo PVY<sup>N</sup>. Contudo, esses nem sempre infectam sistemicamente a batata, não podendo, portanto, ser considerados como integrantes desse grupo (Gebre Selassie et al., 1985). A classificação em grupos, dos isolados provenientes de batata, não pode ser estendida para isolados de PVY provenientes de outras

espécies de solanáceas (Nelson & Wheler, 1978). Isolados oriundos de *N. tabacum* têm sido classificados de acordo com os sintomas induzidos em certos cultivares de fumo, e os isolados de tomate têm recebido pouca atenção (Romero et al., 2001).

Isolados de pimentão têm sido estudados (Makkouk & Gumpf, 1976) e classificados separadamente daqueles que infectam outras solanáceas (Romero et al., 2001). Segundo Gebre Selassie et al. (1985), os isolados de PVY que infectam pimentão podem ser divididos em três patótipos (0, 1, e 1-2), de acordo com a sintomatologia em cultivares diferenciadores. No Brasil, a classificação mais utilizada foi proposta por Nagai (1968; 1971), com base na indução de sintomas em *Nicandra physaloides*. Entretanto, alguns isolados de pimentão têm sido classificados como pertencentes ao serogrupo PVY<sup>0,c</sup>, como, por exemplo, o isolado P21 da Tunísia (Fakhfakh et al., 1995). Moraes et al. (1999) também citam que isolados necróticos, por exemplo, YN-Br e YN-UFLA, foram capazes de infectar pimentão. Truta (2002), estudando isolados de pimenta e pimentão, verificou que alguns possuíam características biológicas e sorológicas que os aproximavam de um isolado necrótico da batata (relativo ao YN-Br).

#### **2.4 PVY: ocorrência e variabilidade no Brasil e no mundo.**

Os fitovírus, especialmente os de RNA, demonstram um alto grau de variabilidade, resultado de três fenômenos que afetam o seu genoma: mutação, recombinação e associação, em vírus com o genoma segmentado (Aaziz & Tepfer, 1999; Worobey & Holmes, 1999; Glais et al., 2002). Segundo Worobey & Holmes (1999), a recombinação é caracterizada como uma mudança de material genético entre dois vírus, duas estirpes e/ou entre o vírus e o hospedeiro, e que a evidência indireta da recombinação de RNA é demonstrada a partir da comparação dos genomas virais. A grande variabilidade genética detectada na natureza tem sido creditada, por alguns autores, à recombinação

gênica entre as estirpes. Uma das primeiras evidências de recombinação ou interação gênica entre duas estirpes de PVY (Y<sup>O</sup> e Y<sup>C</sup>) foi verificada por Watson (1960), através da caracterização biológica e transmissão por afídeos, o qual observou que alguns isolados obtidos de plantas, com infecção intencionalmente mista, induziam sintomas necróticos, típicos de PVY<sup>C</sup>, em cultivares de batata e também eram transmitidos pelos afídeos, como as demais estirpes de PVY.

Isolados de PVY, apresentando diferenças na incidência, nos sintomas induzidos na mesma hospedeira, e em suas características bio-sorológicas, têm sido relatados por vários autores (De Bokx et al., 1975; Gooding & Tolin, 1973; Becnzer et al., 1984; Thompson et al., 1987; Shukla et al., 1988; Jones, 1990; Chrzanowska, 1991; 1994; McDonal & Kristjansson, 1993; Hataya et al. 1994; Le Romancer et al., 1994; De Aquino et al., 1995; Figueira e Pinto, 1995; Figueira et al., 1996; McDonald & Singh, 1996), sendo que em alguns desses foram detectados sítios de recombinação (Revers et al., 1996; Boonham et al., 2002b; Glais et al., 2002; Moury et al., 2002) enquanto que em outros não se chegou a detectar esses sítios, mas foram considerados possíveis recombinantes (Sudarsono et al., 1993; McDonald et al., 1997; Glais et al., 1998; Blanco-Urgoiti et al., 1998b; Kerlan et al., 1999; Boonham et al., 1999).

No Brasil, os primeiros relatos datam da década de 40, quando Nóbrega & Silberschmidt (1944) observaram a ocorrência de um provável variante PVY, oriundo da variedade peruana Serrana Negra, sendo a doença denominada de 'Necrose das Nervuras'. Em 1960, Silberschmidt, examinando lotes de batata-semente provenientes da Alemanha, Holanda, Suécia e Dinamarca, verificou que os lotes provenientes da Holanda, Suécia e Dinamarca não apresentaram a estirpe necrótica do PVY, mas três dos nove lotes vindos da Alemanha apresentaram até 85% de incidência dessa estirpe. A importância e o controle da estirpe necrótica do vírus Y da batata (PVY<sup>N</sup>) em campos de produção de batata-semente são enfatizados por Weidemann (1988) em sua revisão. Além disso,



este autor cita a epidemia que esta estirpe causou, nos anos 50, em diversos países da Europa, tornando-se economicamente importante primeiro na Alemanha, em certos cultivares comerciais totalmente infectados, porém sem apresentar sintomas visíveis.

Chrzanowska (1991; 1994) relatou a ocorrência de um novo isolado de PVY<sup>N</sup>, detectado em 1984, na cv. 'Wilga', em campos do Nordeste da Polônia, em altas concentrações, com alta disseminação e mais infectivo em plantas de batata, induzindo sintomas suaves da doença em comparação com os isolados previamente conhecidos, e incapaz de reagir com um anticorpo monoclonal específico para PVY<sup>N</sup> (Bioreba Company, Switzerland). Os cultivares de batata de padrões resistentes para PNY<sup>N</sup> apresentaram-se susceptíveis ao novo isolado.

Uma nova doença, causando sintoma de anéis necróticos nos tubérculos (PTNRD- potato tuber necrotic ringspot disease), foi diagnosticada pela primeira vez na Hungria (Beczner et al., 1984), sendo denominada de PVY<sup>NTN</sup> e considerada uma variante da estirpe necrótica (Le Romancer & Kerlan, 1991; Le Romancer et al., 1994). Essa se caracteriza pelo desenvolvimento de manchas escuras na superfície dos tubérculos, que se expandem formando arcos e anéis. Esses sintomas necróticos evoluem, e eventualmente, formam lesões deprimidas, levando à rachaduras no tubérculo. Entre os cultivares mais susceptíveis na Hungria estavam Monalisa e Rosalie, com respectiva infecção de 50 e 70% (Beczner et al., 1984). Necrose semelhante, nos tubérculos, foi também detectada no Líbano na cultivar Lola, nos anos de 1988 a 1991.

Nas últimas décadas, alguns relatos no Brasil demonstram a ocorrência de isolados do PVY da batata com características diferentes daquelas observadas para os padrões clássicos (Souza Dias et al., 1992; Figueira & Pinto, 1995; Figueira et al., 1996; Moraes et al., 1999). Andrade & Figueira (1992), analisando tubérculos de batata infectados com o PVY, provenientes das diversas regiões produtoras do Estado de Minas Gerais, verificaram alta

incidência da estirpe comum, em torno de 91,6% dos tubérculos infectados com PVY, sendo que as demais estirpes não chegavam a 10%. Entretanto, em 1995, Figueira & Pinto observaram incidências de mosaico superiores a 50% em plantações de batata cultivar Achat no Sul desse estado. As plantas infectadas apresentavam ramas mais compridas e estioladas, folhas pequenas e ligeiramente rugosas, com mosaico variando de verde normal a ligeiramente mais escuro, na maioria das vezes imperceptível. Os tubérculos apresentavam estolões curtos e ficavam aderidos à haste, sofrendo redução em número e tamanho. Testes sorológicos e a inoculação em plantas indicadoras indicaram se tratar de um isolado da estirpe necrótica do PVY e que, segundo Moraes et al. (1999), este não era capaz de reagir com o anticorpo monoclonal específico para a estirpe necrótica e biologicamente apresentava características de necrótico, em fumo, e de comum em *Physalis*, sendo então designado como PVYN-Br.

O isolado da França originalmente classificado como PVY<sup>N</sup> (Robaglia et al., 1989), foi posteriormente agrupado juntamente com isolados característicos PVY<sup>O</sup>, com base no seqüenciamento genético da região da proteína da capa (van der Vlugt et al., 1993). Alguns anos depois, Revers et al. (1996) detectaram um possível sítio de recombinação na região 3'NTR desse isolado, e finalmente esse foram classificados como pertencente à estirpe comum (Kerlan et al., 1999). Recentemente, Moury et al. (2002) detectaram mais dois pontos de recombinação para esse isolado, na região N1b, e observaram que a parte central da N1b estava mais relacionada com os isolados da estirpe necrótica, enquanto que o resto do genoma se assemelhava mais à estirpe comum.

Sudarsono et al. (1993), estudando seis isolados de PVY, observaram que um isolado chileno que causava necrose em fumo, apresentava 95% de identidade com a estirpe PVY<sup>O</sup>, sugerindo que esse representava um grupo separado de PVY<sup>N</sup> e que a proteína da capa desse teria ancestralidade em comum com a capa de vários isolados PVY<sup>O</sup>. McDonald et al. (1997), estudando

capa e da não traduzível, 3'NTR, de dois isolados brasileiros de PVY, e verificaram, através do alinhamento, que as árvores obtidas revelaram a separação destes isolados em dois grupamentos tipicamente distintos, sendo um compreendendo a estirpe comum e o outro, a estirpe necrótica.

## **2.5 PVY: Caracterização, identificação e classificação de isolados de batata**

De acordo com a sétima edição do ICTV (International Committee on Taxonomy of Viruses), os critérios adotados para definição de espécie dentro do gênero *Potyvirus*, família *Potyviridae*, se baseiam na comparação de seqüências de nucleotídeos e aminoácidos, nas características das proteínas virais, no modo de transmissão, na patogenicidade e citopatologia, nas propriedades antigênicas e na sua gama hospedeira (Berger et al., 2000).

Para a identificação, caracterização e classificação de isolados de PVY, podem ser empregadas diversas técnicas, sendo as mais utilizadas o estudo da sintomatologia em plantas indicadoras, o tipo de transmissibilidade e o peso molecular da proteína da capa, que constituem os ensaios biológicos. Os testes sorológicos são também uma importante ferramenta para a caracterização de isolados virais, os quais englobam diferentes testes como dupla difusão em agar, ELISA, imunomicroscopia eletrônica, etc. Porém, com os avanços da biologia molecular, o desenvolvimento de técnicas como o sequenciamento, RAPD, PCR, AFLP e hibridização de sondas, entre outras, propiciaram um maior entendimento da classificação e uma maior sensibilidade para diagnosticar a variabilidade genética destes isolados.

eventos recombinação. O genoma do padrão Y<sup>N</sup>-W apresentou, nas regiões 5'NTR, P1 e HC-Pro, traços de PVY<sup>NNTN</sup>; contudo, nas proteínas NIa, NIb e CP, a semelhança verificada foi com a PVY<sup>O</sup>. Estes eventos foram detectados por métodos estatísticos, nas regiões P1 para Y<sup>N</sup>-Wi e HC-Pro para este e mais o Y<sup>N</sup>N242. Os alinhamentos múltiplos das seqüências de nucleotídeos, realizados com o programa SiScan, sugeriram fortemente que os genomas de PVY<sup>NW</sup> e PVY<sup>NNTN</sup> são resultados de eventos de recombinação entre isolados de PVY<sup>O</sup> e PVY<sup>N</sup>. Esses autores, através dos traços moleculares, também demonstraram que os recombinantes PVY<sup>N:O</sup> formavam dois serogrupos: PVY<sup>O</sup>, onde reuniram-se os isolados padrão Wilga (YN-Wi e YN242); e o PVY<sup>N</sup>, característico dos PVY<sup>NNTN</sup>. Comparando esses traços às propriedades patogênicas, dos isolados estudados, os autores levantaram a hipótese de que talvez a proteína HC-Pro pudesse estar envolvida na indução de necrose em folhas de fumo, e as proteínas NIa, NIb e/ou CP com a necrose em tubérculos de batata.

Recentemente, Moury et al. (2002) detectaram dois novos pontos de recombinação nas regiões das proteínas 6K2 (em um amino ácido) e da proteína da capa (em vinte e quatro aminoácidos). Eles também observaram a presença de dois possíveis pontos de recombinação para o isolado PVY<sup>N:O</sup>-Fr no gene que codifica para a proteína NIb. Os autores salientaram que a identificação dos eventos de seleção nas diferentes proteínas pode vir a ser útil para desvendar suas funções biológicas, assim como também pode ser essencial ao entendimento dos fatores determinantes externos, como planta hospedeira, inseto vetor e ambientes físicos, e internos, como as funções biológicas das proteínas, que exercem a pressão evolucionária sobre o genoma dos *Potyvirus*.

No Brasil já existem, atualmente, isolados de PVY apresentando características bio-sorológicas diferentes, como relatado anteriormente, porém nenhum trabalho estudando as suas características moleculares tem sido publicado. Inoue-Nagata et al. (2001) sequenciaram as regiões da proteína da

capa e da não traduzível, 3'NTR, de dois isolados brasileiros de PVY, e verificaram, através do alinhamento, que as árvores obtidas revelaram a separação destes isolados em dois grupamentos tipicamente distintos, sendo um compreendendo a estirpe comum e o outro, a estirpe necrótica.

## **2.5 PVY: Caracterização, identificação e classificação de isolados de batata**

De acordo com a sétima edição do ICTV (International Committee on Taxonomy of Viruses), os critérios adotados para definição de espécie dentro do gênero *Potyvirus*, família *Potyviridae*, se baseiam na comparação de seqüências de nucleotídeos e aminoácidos, nas características das proteínas virais, no modo de transmissão, na patogenicidade e citopatologia, nas propriedades antigênicas e na sua gama hospedeira (Berger et al., 2000).

Para a identificação, caracterização e classificação de isolados de PVY, podem ser empregadas diversas técnicas, sendo as mais utilizadas o estudo da sintomatologia em plantas indicadoras, o tipo de transmissibilidade e o peso molecular da proteína da capa, que constituem os ensaios biológicos. Os testes sorológicos são também uma importante ferramenta para a caracterização de isolados virais, os quais englobam diferentes testes como dupla difusão em agar, ELISA, imunomicroscopia eletrônica, etc. Porém, com os avanços da biologia molecular, o desenvolvimento de técnicas como o sequenciamento, RAPD, PCR, AFLP e hibridização de sondas, entre outras, propiciaram um maior entendimento da classificação e uma maior sensibilidade para diagnosticar a variabilidade genética destes isolados.

PVY<sup>N:O</sup>-Wi, não reagindo para os PVY<sup>N:NTN</sup> (Ounouna et al., 2002). Outras regiões do genoma viral têm sido utilizadas para a produção de anticorpos, como, por exemplo, as proteínas CI's (Boudazin et al., 1994; Hammond, 1998).

Os anticorpos policlonais, provenientes da proteína da capa, são eficazes para fazer a diagnose; entretanto, não são capazes de discriminar isolados de PVY (Rose et al., 1987). Chrzanowska (1991; 1994), utilizando anticorpos monoclonais aliados ao teste DAS-ELISA, foi capaz de identificar variantes da estirpe necrótica na Polônia. Resultado semelhante foi obtido por McDonald & Singh (1996), no Canadá. Entretanto, alguns novos isolados de PVY às vezes apresentam diferenças dentro do próprio grupo de estirpes. No Brasil, Moraes et al. (1999) verificaram, através do DAS-ELISA, que o isolado da estirpe necrótica PVY<sup>N</sup>-Br reagiu com os anticorpos policlonais para PVY, mas não reagiu com o anticorpo monoclonal da Agdia, (U.S.A.) específico para PVY<sup>N</sup>, indicando uma possível diferença na região do epitopo.

Daniels (2000), no Rio Grande do Sul, Brasil, após diagnosticar 51 tubérculos infectados com PVY por DAS-ELISA utilizando anticorpos monoclonais para as estirpes Y<sup>O</sup>, Y<sup>N</sup> e Y<sup>C</sup>, verificou uma ocorrência de 94%, 2% e 0%, respectivamente, e de 6% para as infecções mistas de Y<sup>O</sup> + Y<sup>N</sup>; entretanto, o autor afirma que devido ao pequeno número de amostras, estes resultados não podem ser representativos para regiões da Serra e do Planalto, bem como para a Região Nordeste e o Sul rio-Grandense, mas que este fato, diferentemente das regiões produtoras de Minas e São Paulo, onde tem sido observada alta incidência de PVY<sup>N</sup>, poderia ser confirmado com um levantamento mais abrangente. Barrocas et al. (2000) relataram que em Minas Gerais, no período de 1995/99, 13% do total de lotes de batatas-semente indexadas (DAS-ELISA policlonal), oriundos de diferentes regiões produtoras do estado, foram condenados por PVY.

As diferenciações biológicas e sorológicas fornecem resultados que podem ser considerados bons para discriminação entre as estirpes comum e necrótica do PVY. Entretanto, no caso da variante NTN, embora alguns autores tenham obtido um sucesso razoável na sua diferenciação biológica, como Le Romancer et al. (1994), isso só é possível quando um grande número de isolados é utilizado (Weilguny & Singh, 1998). Apesar de a taxonomia de *Potyvirus* ser uma das mais bem definidas, entre todos os gêneros de vírus de plantas, a abordagem biológica clássica (gama de hospedeiros e sintomatologia), utilizada para diferenciar espécies desse gênero em subgrupos ou estirpes, é insatisfatória e não deve ser o único critério adotado (Hollings & Brunt, 1981).

### 2.5.2 Caracterização Molecular

Com o advento das técnicas moleculares, novas ferramentas, como Dot-blot, PCR, clonagem e/ou sequenciamento, vêm sendo utilizadas na maioria dos ramos da ciência. A seqüência completa de nucleotídeos de diversos membros do gênero *Potyvirus* já é conhecida (Allison et al., 1986; Domier et al., 1986; Maiss et al., 1989; Johansen et al., 1991; Nicolas & Laliberté, 1992; Vance et al., 1992; Thole et al., 1993). Os primeiros isolados de PVY seqüenciados foram PVY-D (Shukla et al., 1986) e PVY10, 18 e 43 (Shukla et al., 1988), da Austrália, utilizando a técnica de sequenciamento de proteínas e digestão enzimática. Esses isolados apresentaram uma homologia de 92% com PeMV e de 62% para TEV. Posteriormente, o isolado PVY<sup>N</sup>, da França (Robaglia et al., 1989), foi totalmente seqüenciado utilizando a técnica do dideoxinucleotídeo terminal elaborada por Sanger et al. (1977), sendo esse o método mais utilizado atualmente. A partir de então, vários trabalhos de caracterização molecular surgiram na fitovirologia: van der Vlugt (1989 e 1993); Hidaka et al. (1992); Sudarsono et al. (1993); Thole et al. (1993); Dhar et al. (1994); Tordo et al.



(1995); Jakab et al. (1997); Oshima et al. (2000); Inoue-Nagata et al. (2001) e Booham et al. (2002b), entre outros.

Pesquisadores de vários países produtores de batata têm trabalhado na identificação de seqüências específicas nos variantes genéticos de PVY com a finalidade de desenhar primers e sondas (Cerovská et al., 2001; Boonham et al., 2002a; Nie & Singh, 2002a; 2002b; Moravec et al., 2003), e anticorpos monoclonais específicos (Cerovská, 1998; Ounouna et al., 2002), permitindo maior precisão e rapidez na diagnose. Na análise molecular de fitopatógenos, dentre as técnicas mais utilizadas encontra-se a PCR; vários trabalhos a empregaram na detecção e diferenciação de isolados (Langeveld et al., 1991; Henson & French, 1993; Brioso et al., 1996; Singh & Singh, 1998). Entretanto, se tratando da diferenciação de isolados próximos, variações na PCR, como PCR-RFLP (Glais et al., 1998; 2002; Rosner & Maslenin, 1999; Romero et al., 2001), 3-primer PCR (Weilguny & Singh, 1998; Moravec et al., 2003), IC-PCR (Dedic & Ptáček, 1999), “nested-PCR” e “multiplex-PCR” (Nie & Singh, 2000; 2001), fluorescência competitiva-CF RT-PCR (Walsh et al., 2001), entre outras, têm apresentado sensibilidade superior à RT-PCR e hibridização.

A proteína capsidial (CP) é o produto gênico mais seqüenciado e estudado (Shukla & Ward, 1989a; b) entre os *Potyvirus*, principalmente para o PVY (Wefels et al., 1989; Bravo-Almonacid, 1989; Hay et al., 1989; Puurand & Saarma, 1990; Zhou et al., 1990; Oshima et al., 1991; Sudarsono et al., 1993; Dhar & Singh, 1997; McDonald et al., 1997; Cerovská et al., 2001). Essa proteína possui diversas funções, como encapsidação do RNA, transmissão por afídeos, movimento célula a célula, movimento à longa distância e indução de sintomas. Estudos de comparação de seqüências de aminoácidos e análise de montagem de partículas virais indicaram a presença de três regiões distintas na CP: uma região amino-terminal, variável em tamanho e seqüência; uma região central, altamente conservada, com 215 a 227 aminoácidos; e uma região

carboxi-terminal com 18 a 20 aminoácidos. As regiões amino e carboxi-terminais da CP, voltadas para o exterior da molécula, são responsáveis pelas propriedades antigênicas da partícula viral (Shukla & Ward, 1989b; Shukla et al., 1994). Recentemente, Glais et al. (2002) sugeriram que as proteínas NIa, NIB e/ou CP talvez estejam envolvidas na indução de necrose nos tubérculos e que a região C-terminal da HC-Pro esteja envolvida na necrose das folhas de fumo.

A análise das seqüências de nucleotídeos dos isolados de PVY<sup>N</sup>-Fr (Robaglia et al., 1989) e PVY<sup>NTN</sup>-H (Thole et al., 1993) que possuem sequenciamento completo demonstrou que o grau de similaridade das seqüências difere entre as várias regiões do genoma. A identidade dos nucleotídeos totais, entre estes dois isolados, foi de 88,5%, enquanto a região não traduzível 5'(5' NTR) e a região codificante, adjacente, P1, possuíam somente 70,3% e 72,6% de similaridade, respectivamente. O segmento 5' terminal demonstrou ser a região de maior variabilidade, no genoma dos PVY, quando comparado com os 90,6% de identidade dos nucleotídeos, dos genes do capsídeo, e com 80,6% - 90,3% de identidade para as proteínas não-estruturais, dominantes (Tordo et al., 1995).

Nie & Singh (2002a; 2002b) estudando a seqüência de nucleotídeos, correspondente à região 5' NTR e P1 de isolados necróticos e NTN, verificaram que os isolados NTN da Europa e América do Norte formaram grupos separados, com homologia de 98% dentro de cada grupo e de 90% entre os grupos. Os isolados NTN de cada grupo foram ainda estreitamente relacionados com a estirpe necrótica de seu próprio grupo, indicando possível evolução do NTN a partir de isolados necróticos da mesma região geográfica. Com base nessas seqüências, foi realizada a RT-PCR competitiva, bem como padrões de restrição para diferenciação dos isolados da Europa (PVY<sup>NTN</sup>) e América do Norte (PVY<sup>N</sup> e PVY<sup>NTN</sup>). Os autores sugerem essas regiões para a determinação da possível origem geográfica entre os isolados de PVY<sup>NTN</sup>.

### 3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AAZIZ, R.; TEPLER, M. Recombination in RNA viruses and in virus resistant transgenic plants. **Journal of General Virology**, Great Britain, v.80, n.6, p.1339-1346, june, 1999. 7 N

AGRIANUAL – Anuário da Agricultura Brasileira. São Paulo, FNP: Consultoria e Comércio, 2002.

ALLISON, R.; JOHNSTON, R.E.; DOUGHERTY, W.G. The nucleotide sequence of the coding region of Tobacco Etch Virus genomic RNA; evidence for synthesis of a single polyprotein. **Virology**, New York, v.154, n.1, p.9-20, 1986. 23 N

ANDRADE, E.R.D.; FIGUEIRA, A. R. Incidência e sintomatologia de estirpes do vírus Y (PVY) nas regiões produtoras de batata do sul de Minas Gerais. **Ciência e Prática**, Lavras, v.16, n. 3, p.371-376, jul./set. 1992. 5 02

BARROCAS, E.N. et al. Ocorrência dos vírus Y (PVY) e do enrolamento da folha da batata(PLRV) nos lotes de batata-semente provenientes das diferentes regiões produtoras de Minas Gerais. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.25, p.473, 2000. Suplemento. 1

BECZNER, L. et al. Studies on the etiology of tuber necrotic ringspot disease in potato. **Potato Research**, Wageningen, v.27, p.339-352, 1984. 13 N

BERGER, P.H. et al. Potyviridae. In: van Regenmortel, M.H.V. et al. (Ed.). **Virus taxonomy**. San Diego: Academic Press, 2000. p.703-24. (Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses). 21 N

BLANCO-URGOITI, B. et al. Characterization of potato potyvirus Y (PVY) isolates from seed potato batches. Situation of the NTN, Wilga and Z isolates. **European Journal of Plant Pathology**, Netherlands, v.104, n.8, p.811-819, 1998b. 8 N

BLANCO-URGOITI, B. et al. Potato virus Y group C isolates are a homogeneous pathotype but two different genetic strains. **Journal of General Virology**, Great Britain, v.79, pt.8, p.2037-42, Aug. 1998a. 5 N

BOONHAM, N. et al. Biological and sequence comparisons of Potato virus Y isolates associated with potato tuber necrotic ringspot disease. **Plant Pathology**, Oxford, v.51, n.2, p.117-126, Apr. 2002b.

BOONHAM, N. et al. Potato virus Y from *Petunia* can cause symptoms of potato tuber necrotic ringspot disease (PTNRD). **European Journal of Plant Pathology**, Netherlands, v.105, n.6, p.617-621, 1999.

BOONHAM, N. et al. The detection of tuber necrotic isolates of Potato virus Y, and the accurate discrimination of PVY(O), PVY(N) and PVY(C) strains using RT-PCR. **Journal of Virological Methods**, v.102, n.1-2, p.103-12, Apr. 2002a.

BOONHAM, N.; BARKER, I. Strain specific recombinant antibodies to potato virus Y potyvirus. **Journal of Virological Methods**, v.74, n.2, p.193-199, Oct. 1998.

BOUDAZIN, G. et al. Reactivity of two monoclonal antibodies to the cylindrical inclusion protein of potato virus Y. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v.141, n.2, p.186-194, 1994.

BRAVO-ALMONACID, F.; MENTABERRY, A.N. Nucleotide cDNA sequence coding for the PVY<sup>o</sup> coat protein. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v.17, n.11, p.4401, 1989.

BRIOSO, P.S.T. et al. Detecção de vírus da batata em plantas infectadas e em afídeos virulíferos através dos testes de "Polymerase Chain Reaction" e de "Dot-blot". **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.21, n. 3, p.328-335, 1996.

BRUNT, A.A. et al. **Viruses of plants: descriptions and lists from the VIDE database**. Wallingford: CABInternational, 1996. 1484p.

BUTUROVIC, D.; KUS, M. The occurrence of potato tuber ring necrotic disease in Yugoslavia. **Potato Research**, Wageningen, v.33, p.138, 1990. (Abstrac)

CARRINGTON, J.C.; FREED, D.D.; OH, C.-S. Expression of potyviral polyproteins in transgenic plants reveals three proteolytic activities required for complete processing. **EMBO Journal**, v.9, n.5, p.1347-1353, 1990.

CEROVSKÁ, N. et al. Nucleotide sequences of 5'-terminal parts of coat protein genes of various isolates of NTN strain of potato virus Y. **Acta Virologica**, v.45, n.1, p.55-9, Feb. 2001.

CEROVSKÁ, N. et al. Partial antigenic characterization of different potato virus Y NTN strain isolates. *Acta Virologica*, v.43, n.6, p.391-3, Dec. 1999. 3 P

CEROVSKÁ, N. Production of monoclonal antibodies to potato virus YNTN strain and their use for strain differentiation. *Plant Pathology*, Oxford, v.47, n.4, p.505-509, 1998. B. 5

CHACHULSKA, A.M.; CHRZANOWSKA, M.; ROBAGLIA, C.; ZAGORSKI, W. Tobacco veinal necrosis determinants are unlikely to be located within the 5' and 3' terminal sequences of the potato virus Y genome. *Archives of Virology* v.142, n.4, p.765-770, April, 1997. E N

CHRZANOWSKA, M. Differentiation of potato virus Y (PVY) isolates. *Phytopathologia Polonica*, Poznan, v.8, n.20, p.15-20, 1994. 5 N

CHRZANOWSKA, M. New isolates of the necrotic strain of potato virus Y (PVY<sup>N</sup>) found recently in Poland. *Potato Research*, Wageningen, v.34, n.2, p.179-182, 1991. 4

CHRZANOWSKA, M. The reaction of polish potato cultivares to PVY<sup>NTN</sup>. In: *The 9th EAPR. Virology section meeting*, june, 18-22, Rideuo, Bled, Slovenic. p.39-40, 1995. 2 N

DANIELS, J. Identificação sorológica de estirpes do vírus Y da batata do Sul do Brasil. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v.25, n.3, p.265, Set. 2000. ,

DE AQUINO, L.; DALMAY, T.; BURGYÁN, J. Host range and sequence analysis of isolate of Potato Virus Y inducing veinal necrosis in pepper. *Plant Disease*, St. Paul, v.79, n.10, p.1046-1050, Oct. 1995. 5 N

DE BOKX, J.A. Potato Virus Y. In: HOOKER, W.J. (ed.). *Compendium of potato diseases*. Saint Paul: American Phytopathological Society, 1981. p.70-71 N

DE BOKX, J.A.; HUTTINGA, H. *Potato virus Y* Kew, England: Commonw. Mycol. Inst. / Asso. Appl. Biology, 1981. (Descriptions of Plant Viruses. No. 242). 1

DE BOKX, J.A.; KRATCHANOVA, B.; MAAT, D.Z. Some properties of a deviating strains of potato virus Y. *Potato Research*, Wageningen, v.18, n.1, p.38-51, 1975. N

DE BOKX, J.A.; PIRON, P.G.M. Effect of temperature on symptom expression and relative virus concentration in potato plants infected with potato virus Y<sup>N</sup> and Y<sup>O</sup>. *Potato Research*, Wageningen, v.20, n.3, p.207-213, 1977. 7 N

DEDIC, P.; PTÁČEK, J. The possibility of specific PVY-NTN detection. In: *Proceedings 10<sup>th</sup> EAPR Virology section meeting*, Baden, Austria, 1999. 3p.

DHAR, A.K.; SINGH, R.P. Molecular characterization of coat protein genes of serologically distinct of potato virus Y necrotic strain. *Canadian Journal of Microbiology*, Canada, v.43, n.7, p.677-683, Jul. 1997. 3 7

DHAR, A.K.; SINGH, R.P.; BOUCHER, A. Molecular cloning and sequencing of the capsid and the nuclear inclusion protein genes of a North American PVY<sup>N</sup> isolate. *Canadian Journal of Microbiology*, Canada, v.40, n.9, p.798-804, Sept. 1994. 7

DOMIER, L.L. et al. The nucleotide sequence of tobacco vein mottling virus RNA. *Nucleic Acids Research*, Oxford, v.14, n.13, p.5417-5430, 1986. 7

DOUGHERTY, W.G.; CARRINGTON, J.C. Expression and function of potyviral gene products. *Annual Review of Phytopathology*, Palo Alto, v.26, p.123-143, 1988. 14

EDWARDSON, J.R; CHRISTIE, R.G; KO, N.J. Potyvirus cylindrical inclusions - Subdivision-IV. *Phytopathology*, St. Paul, v.74, n.9, p.1111-1114, 1984. 21

ELLIS, P. et al. Production of monoclonal antibodies for detection and identification of strains of potato virus Y. *Canadian Journal of Plant Pathology*, Guelph, v.18, n.1, p.64-70, 1996. 6 2 120

ELLIS, P.; STACE-SMITH, R.; DE VILLIERS, G. Identification and Geographic distribution of serotypes of Potato Virus Y. *Plant Disease*, St. Paul, v.81, n.5, p.481-484, May 1997. 4 P. 2

FAKHFAKH, H. et al. Polymorphisme des régions capsid et 3' -NTR de 3 isolats tunisiens du virus Y de la pomme de terre (PVY). *Agronomie*, Paris, v.15, n.9-10, p.569-79, 1995. 4

FIGUEIRA, A.R. *Viroses da Batata: situação atual e perspectivas futuras. Informe Agropecuário*, Belo Horizonte, v.20, n.197, p.86-96, mar./abr. 1999. 4

FIGUEIRA, A.R.; MORAES, F.H.R.; PINTO, A.C.S. New PVY necrotic strain is causing great losses in Brazil. *Phytopathology*, St. Paul, v.86, n.11, p.885, Nov. 1996. (Supplement. Abstracts, 761A).

FIGUEIRA, A.R.; PINTO, A.C.S. Estirpe necrótica do vírus Y da batata em sementes importadas esta causando problemas ao bataticultor mineiro. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v.20, p.299, ago.1995. (Suplemento).

GEBRE SELASSIE, K. et al. Variabilité naturelle des souches du virus Y de la pomme de terre dans les cultures de piment du sud-est de la France. Caractérisation et classification en pathotypes. *Agronomie*, Paris, v.5, n.7, p.621-630, 1985.

GLAIS L. et al. RFLP mapping of the whole genome of ten viral isolates representative of different biological groups of potato virus Y. *Archives of Virology*, Austria, v.143, n.11, p.2077-2091, Nov. 1998.

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

GOODING Jr., G.V.; TOLIN, S.A. Strains of potato virus Y affecting fluecured tobacco in the southeastern United States. *Plant Disease Reporter* v.57, p.200-204, 1973.

GUGERLI, P.; FRIES, P. Characterization of monoclonal antibodies to Potato Virus Y and their use for virus detection. *Journal General of Virology*, Great Britain, v.64, n.11, p.2471-2477, 1983.

HAMMOND, J. Serological relationships between the cylindrical inclusion proteins of potyviruses. *Virology*, New York, v.88, n.9, p.965-971, 1998.

HATAYA, T. ET AL. Characterization and strain identification of a potato virus Y isolate non-reactive with monoclonal antibodies specific to the ordinary and necrotic strains. *Intervirology*, Switzerland, v.37, n.1, p.12-19, 1994.

HAY, J.M.; FELLOWES, A.P.; TIMMERMAN, G.M. Nucleotide sequence of the coat protein gene of a necrotic strain of potato virus Y from New Zealand. *Archives of Virology*, Austria, v.107, n.1-2, p.111-122, 1989.



HENSON, J.M.; FRENCH, R. The Polymerase Chain Reaction and plant disease diagnosis. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v.31, p.81-109, 1993. 3

HIDAKA, M. et al. Cloning and sequencing of the 3' half of potato virus Y (0 strain) genome encoding the 5K protein, protease, polymerase and coat protein. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v.20, n.13, p.3515, 1992. 2

HOLLINGS, M.; BRUNT, A.A. **Potyvirus group** London: Commonw. Mycol. Inst. / Asso. Appl. Biol., 1981. 7p. (Descriptions of Plant Viruses, 245). 7

HOOKER, W.J. (Ed) **Compendium of Potato Diseases**. Saint Paul, American Phytopathological Society, 1981. 125p. 125

INOUE-NAGATA, A.K. et al. Analysis of the nucleotide sequence of the coat protein and 3'-untranslated region of two Brazilian *Potato virus Y* isolates. **Fitopatologia Brasileira**, Brasilia, v.26, n.1, p.45-52, Mar. 2001.

JAKAB, G. et al. Infectious in vivo and in vitro transcripts from full-length cDNA clone of PVY-N605, a Swiss necrotic isolate of potato virus Y. **Journal of General Virology**, Great Britain, v.78, n.12, p.3141-3145, Dec. 1997.

JOHANSEN, E. et al. The complete nucleotide sequence of pea seed-borne mosaic virus RNA. **Journal of General Virology**, Great Britain, v.72, n.11, p.2625-2632, 1991. 8

JONES, R.A.C. Strain group specific and virus specific hypersensitive reactions to infection with potyviruses in potato cultivars. **Annals of Applied Biology**, Great Britain, v.117, n.1, p.93-106, 1990. 14

KERLAN, C.; TRIBODET, M.; GLAIS, L.; GUILLET, M. Variability of potato virus Y in potato crops in France. **Journal of Phytopathology**, v.147, p.643-651, 1999. 9

LANGEVELD, S.A. et al. Identification of potyviruses by polymerase chain reaction with degenerate primers. **Journal of General Virology**, Great Britain, v.72, n.7, p.1513-1541, 1991.

LE ROMANCER, M.; KERLAN, C. La maladie des nécroses annulaires superficielles des tubercules: une affection de la pomme de terre, due au virus Y. **Agronomie**, Paris, v.11, n.10, p.889-900, 1991.

LE ROMANCER, M.; KERLAN, C.; NEDELLEC, M. Biological characterisation of various geographical isolates of potato virus Y inducing superficial necrosis on potato tubers. **Plant Pathology**, Oxford, v.43, n.1, p.138-144, 1994. B-5

LE ROMANCER, M.; NEDELLEC, M. Effect of plant genotype, virus isolate and temperature on the expression of the potato tuber necrotic ringspot disease (PTNRD). **Plant Pathology**, Oxford, v.46, n.1, p.104-111, 1997.

MAISS, E. et al. The complete nucleotide sequence of Plum Pox Virus RNA. **Journal of General Virology**, Great Britain, v.70, n.3, p.513-524, 1989. N

MAKKOUK, K.M.; GUMPF, D.J. Characterization of potato virus Y strains isolated from pepper. **Phytopathology**, St. Paul, v.66, n.5, p.576-581, 1976.

McDONALD, J.G. et al. Coat protein and 5' nontranslated region of a variant of potato virus Y. **Canadian Journal of Plant Pathology**, Guelph, v.19, n.2, p.138-144, 1997.

McDONALD, J.G.; KRISTJANSSON, G.T. Properties of strains of potato virus Y<sup>N</sup> in North America. **Plant Disease**, St. Paul, v.77, n.1, p.87-89, 1993. B-16

McDONALD, J.G.; SINGH, R.P. Assessment of North America isolate of PVYN for strains that induce tuber necrotic ring necroses disease. **American Potato Journal**, v.70, n.11, p.827, 1993.

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

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

MORAVEC, T.; CEROVSKÁ, BOONHAM, N. The detection of recombinant, tuber necrosing isolates of Potato virus Y (PVY<sup>NTN</sup>) using a three-primer PCR based in the coat protein gene. **Journal of Virological Methods**, v. 109, n.1, p. 63-68, Apr. 2003. W

MOURY, B. et al. Evidence for diversifying selection in Potato virus Y and in the coat protein of other potyviruses. **Journal of General Virology**, Great Britain, v.83, n.11, p.2563-2573, 2002. W

NAGAI, H. Novas variedades de pimentão resistentes ao mosaico causado por vírus Y. **Bragantia**, v.30, p.93-100, 1971.

NAGAI, H. Obtenção de variedades de pimentão resistentes ao mosaico. **Bragantia**, v.27, p. 311-353, 1968.

NELSON, M. S.; WHEELER, R. E. Biological and serological characterization and separation of potyviruses that infect pepper. **Phytopathology**, St. Paul, v.68, n.7, p.979-984, 1978.

NICOLAS, O.; LALIBERTÉ J. -F. The complete nucleotide sequence of turnip mosaic potyvirus RNA. **Journal of General Virology**, Great Britain, v.73, n.11, p.2785-2793, 1992.

NIE, X.; SINGH, R.P. A new approach for the simultaneous differentiation of biological and geographical strains of Potato virus Y by uniplex and multiplex RT-PCR. **Journal of Virological Methods**, v.104, n.1, p.41-54, June 2002b.

NIE, X.; SINGH, R.P. A novel usage of random primers for multiplex RT-PCR detection of virus and viroid in aphids, leaves, and tubers. **Journal of Virological Methods**, v.91, n.1, p.37-49, Jan. 2001.

NIE, X.; SINGH, R.P. Detection of multiple potato viruses using an oligo(dT) as a common cDNA primer in multiplex RT-PCR. **Journal of Virological Methods**, v.86, n.2, p.179-85, May 2000.

NIE, X.; SINGH, R.P. Probable geographical grouping of PVY(N) and PVY(NTN) based on sequence variation in P1 and 5'-UTR of PVY genome and methods for differentiating North American PVY(NTN). **Journal of Virological Methods**, v.103, n.2, p.145-56, May 2002a.

NÓBREGA, N.R.; SILBERSCHMIDT, K. Sobre uma provável variante do vírus "Y" da batatinha (*Solanum virus 2*, Orton) que tem a peculiaridade de provocar necroses em plantas de fumo. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.15, art.18, p.307-330, Dez. 1944.

OHSHIMA, K. et al. Comparison of biological properties, serological characteristics and amino acid sequences of coat protein between potato virus Y ordinary strain and necrotic strain. **Annals of the Phytopathological Society of Japan**, v.57, p.615-622, Dec. 1991.

OHSHIMA, K. et al. Potato tuber necrotic ring spot disease occurring in Japan: Its association with *Potato virus Y* necrotic strain. **Plant Disease**, St. Paul, v.84, n.10, p.1109-1115, 2000.

OHSHIMA, K. et al. Production and characteristics of strain common antibodies against a synthetic polypeptide corresponding to the C-terminal region of potato virus Y coat protein. **Journal of Virological Methods**, v.40, n.3, p.265-273, 1992.

OUNOUNA, H. et al. Production of monoclonal antibodies against synthetic peptides of the N-terminal region of *Potato virus Y* coat protein and their use in PVY strain differentiation. **Plant Pathology**, Oxford, v.51, n.4, p.487-494, Aug. 2002.

PUURAND, U; SAARMA, M. Cloning and Sequencing of the 3'-terminal region of potato virus Y<sup>N</sup> (rusian isolate) RNA genomic. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v.18, n.22, p.6694, 1990.

REVERS, F. et al. Frequent occurrence of recombinant potyvirus isolates. **Journal of General Virology**, Great Britain, v.77, pt.8, p.1953-65, Aug. 1996.

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

ROBAGLIA, C. et al. Nucleotide sequence of potato virus Y (N strain) genomic RNA. **Journal of General Virology**, Great Britain, v.70, n.4, p.935-947, 1989.

ROMERO, A. et al. Characterization of typical pepper-isolates of PVY reveals multiple pathotypes within a single genetic strain. **Virus Research**, v.79, n.1-2, p.71-80, Nov. 2001.

ROSE, D.G.; HUBBARD, A.L. Production of monoclonal antibodies for the detection of potato virus Y. **Annual Applied Biology**, Great Britain, v.109, p.317-321, 1986.

ROSE, D.G.; MCCARRA, S.; MITCHELL, D.H. Diagnosis of potato virus Y<sup>N</sup>: a comparison between polyclonal and monoclonal antibodies and a biological assay. **Plant Pathology**, Oxford, v.36, n.1, p.95-99, Mar. 1987.

ROSNER, A.; MASLENIN, L. Differentiating PVY<sup>NTN</sup> by unique single-restriction cleavage of PCR products. *Potato Research*, Wageningen, v.42, n.2, p.215-221, 1999.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COUSON, A.R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v.74, p.5463-5466, 1977.

SANZ, A. et al. Preparation of additional monoclonal antibodies for detection and discrimination of potato virus Y isolates infecting potato. *Potato Research*, Wageningen, v.33, n.3, p.365-375, 1990.

SERRA, M.C.; WEIDEMANN, H.L. First report of Potato Tuber Necrotic Ringspot disease caused by PVY<sup>NTN</sup> in Portugal. *Plant Disease*, St. Paul, v.81, n.6, p.694, 1997. (Abstrac)

SHUKLA, D.D. et al. Coat protein of Potyviruses 4. Comparasion of biological properties, serological relationship, and coat protein amino acid sequences of four strains of potato virus Y. *Archives of Virology*, Austria, v.102, p.207-219, 1988.

SHUKLA, D.D. et al. Coat protein of Potyviruses. 2. Amino acid sequence of the coat protein of Potato Virus Y. *Virology*, New York, v.152, p.118-125, 1986.

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

SHUKLA, D.D.; WARD, W. Structure of Potyvirus coat proteins and its application in the taxonomy of the Potyvirus group. *Advances in Virus Research*, v.36, p.273-314, 1989b.

SHUKLA, D.D.; WARD, C.W. Identification and classification of potyviruses on the basis of coat protein sequence data and serology: Brief review. *Archives of Virology*, Austria, v.106, n.3-4, p.171-200, 1989a.

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

SILBERSCHMIDT, K.; KRAMER, M. O vírus Y, uma das principais causas da degenerescência das batatinhas no estado de São Paulo. *O Biológico*, São Paulo, v.3, n.2, p.39-47, 1942.

SILBERSCHMIDT, K.M. Types of potato virus Y necrotic to tobacco history and recent observation. *American Potato Journal*, v.37, n.5, p.151-159, 1960.

SINGH, P.R.; SINGH, M. Specific detection of Potato Virus A in dormant tubers by reverse transcription polymerase chain reaction. *Plant Disease*, St. Paul, v.82, n.2, p.230-234, Feb. 1998.

SINGH, R.P. et al. Selection of a monoclonal antibody to detect PVY<sup>N</sup> and its use in ELISA and DIBA assays. *Canadian Journal of Plant Pathology*, Guelph, v.15, n.4, p.293-300, 1993.

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

SOUZA DIAS, J.A.C. et al. Batata-semente certificada da Argentina encontra-se dentro dos padrões brasileiros de sanidade a vírus, mas a presença dos vírus Y<sup>N</sup> e do mosaico da alfafa suscita preocupações. *Summa Phytopathologica*, São Paulo, v.18, n.1, p.35, Jan-Mar. 1992. (Resumo).

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

STACE-SMITH, R.; TREMAINE, J.H. Purification and Composition of potato virus Y. *Phytopathology*, St. Paul, v.60, p.1785-1789, Dec. 1970.

STEINBACH, P.; HAMANN, U. Symptome und Ursache einer wenig bekannten Ringnekrose der Kartoffelknolle. *Archiv fur Phytopathologie und Pflanzenschutz*, Berlin, v.25, n.3, p.223-232, 1989.

SUDARSONO, J.B.Y. et al. Nucleotide sequence of the capsid protein cistrons from six potato virus Y (PVY) isolates infecting tobacco. *Archives of Virology*, Austria, v.132, n.1-2, p.161-170, 1993.

THOLE, V. et al. Cloning and sequencing of potato virus Y (Hungarian isolate) genomic RNA. *Gene*, Amsterdam, v.123, n.2, p.149-156, 1993.

THOMPSON, G.J.; HOFFMAN, D.C.A.; PRINS, P.J. A deviant strain of potato virus Y infecting potatoes in South Africa. *Potato Research*, Wageningen, v.30, p.219-228, 1987.

THORNBURY, D.W. et al. Comparative sequence of the helper component (HC) region of potato virus Y and a HC-defective strain, potato virus C. *Virology*, New York, v.178, n.2. p.573-578, 1990.

TOMASSOLI, L. et al. Occurrence of Potato Tuber Necrotic Ringspot disease (PTNRD) in Italy. *Plant Disease*, St. Paul, v.82, n.3, p.350, 1998. (Abstrac).

TORDO, V.M. et al. Sequence polymorphism in the 5'NTR and in the P1 coding region of potato virus Y genomic RNA. *Journal of General Virology*, Great Britain, v.76, n.4, p.939-949, Apr. 1995.

TRUTA, A.A.C. D.S., *Identidade e propriedades de isolados de potyvirus provenientes de Capsicum*. 2002. 72p. Tese (Doutorado em Fitopatologia)- Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

VAN DER VLUGT, R. et al. Nucleotide sequence of the 3' - terminal region of Potato Virus Y<sup>N</sup> RNA. *Journal of General Virology*, Great Britain, v.70, n.1, p.229-233, Jan. 1989.

VAN DER VLUGT, R.A.A.; LEUNISSEN, J.; GOLDBACH, R. Taxonomic relationships between distinct potato virus Y isolates based on detailed comparison of the viral coat proteins and 3'-nontranslated regions. *Archives of Virology*, Austria, v.131, n.3-4, p.361-375, 1993.

VAN REGENMORTEL, M.H.V. et al. (Ed.). *Virus taxonomy*. Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. San Diego: Academic Press, USA 2000. 1.162p.

VANCE, V.B. et al. The complete nucleotide sequence of pepper mottle virus genomic RNA: Comparison of the encoded polyprotein with those of other sequenced potyviruses. *Virology*, New York, v.191, n.1, p.19-30, 1992.

WALSH, K. et al. Detection of different strains of Potato virus Y and their mixed infections using competitive fluorescent RT-PCR. *Journal of Virological Methods*, v.91, n.2, p.167-173, Feb. 2001.

WATSON, M.A. Evidence for interaction or genetic recombination between Potato Viruses Y and C in infected plants. *Virology*, New York, v.10, p.211-232, 1960.

WEFELS, E. et al. Cloning of the potato virus Y genes encoding the capsid protein CP and the nuclear inclusion protein Nlb. **Archives of Virology**, Austria, v.107, n.1-2, p.123-134, 1989.

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

WEILGUNY, H.; SINGH, R.P. Separation of Slovenian isolates of PVY<sup>NTN</sup> from the North American isolates PVY<sup>N</sup> by a 3-primer PCR. **Journal of Virological Methods**, v.71, p.57-68, Mar. 1998. N

WOROBAY, M.; HOLMES, E.C. Evolutionary aspects of recombination in RNA viruses. **Journal of General Virology** Great Britain, v.80, n.10, p.2535-2543, 1999.

ZERBINI, F.M.; MACIEL-ZAMBOLIM, E. A Família *Potyviridae* – parte II. **RAPP**, v.8, p.225-265, 2000. B: b

ZERBINI, F.M.; MACIEL-ZAMBOLIM, E. A Família *Potyviridae* – parte I. **RAPP**, v.7, p.01-66, 1999. B: b

ZHOU, X.R. et al. cDNA sequence of the 3' noncoding region of the PVY genome (the Chinese isolate). **Nucleic Acids Research**, Oxford, v.18, p.5554, 1990.



## **CAPÍTULO 2**

**Comparação biológica e sorológica de isolados do *Potato Virus Y* (PVY) e análise de dialelos parciais empregando 17 cultivares de batata.**

## 1 RESUMO

MORAES, Flávio Henrique Reis. Comparação biológica e sorológica de isolados do *Potato Virus Y* (PVY) e análise de dialelos parciais empregando 17 cultivares de batata. In: \_\_\_\_\_. **Caracterização de isolados do vírus Y (*Potato Virus Y* - PVY) provenientes de batata no Brasil.** 2003. p.34-64. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.<sup>1</sup>

Foram estudados vinte isolados de PVY ( 11 PVY<sup>N</sup> e 09 PVY<sup>O</sup>), detectados em batata proveniente de diversas regiões produtoras do Brasil. Após testados por DAS-ELISA, com anticorpos policlonais, eles foram inoculados em 15 espécies indicadoras e os isolados necróticos foram submetidos a DAS-ELISA, com anticorpos monoclonais para PVY<sup>N</sup>. Quatro isolados escolhidos foram inoculados em 17 cultivares de batata para estudos de dialelos parciais. Com exceção do YO-07Mg, os sintomas induzidos pelos isolados necróticos foram mais variáveis do que os induzidos pelos comuns. Considerando-se os sintomas em fumo (*Nicotiana. Tabacum*), cvs. Turkish, Turkish NN (TNN) e Havana, *N. glutinosa*, *N. rustica* e *Physalis floridana*, os isolados necróticos foram divididos em três grupos: I (Br-Mg, Br2-MG, 404Sp e 45-5), com sintomas mais leves em fumo e severos em *Physalis*; II (UFLA, Mg1, 21Sp, 22Sp, Velox21 e Cris01), com sintomas mais severos em fumo e mosaico em *Physalis*; III (Cris02), foi semelhante ao I, exceto por induzir sintomas mais severos em fumo Turkish e TNN. Quando testados com os anticorpos monoclonais para PVY<sup>N</sup> da Agdia (26000 e 26001), os isolados YNBr-Mg e YNBr2-Mg não reagiram com o primeiro e apresentaram uma fraca reação com o segundo, enquanto que os isolados YN404Sp e YN45-5 não reagiram com o segundo e apresentaram fraca reação com primeiro anticorpo. Nos sintomas induzidos nas 17 cultivares de batata houve a predominância do mosaico, mas algumas delas mostraram lesões necróticas nas nervuras, pecíolos e hastes, apresentando, às vezes, o colapso das folhas, numa típica reação de hipersensibilidade. A análise de dialelos parciais demonstrou variabilidade nas resistências horizontal e vertical das cultivares de batata e na agressividade e virulência dos isolados de PVY. As cultivares Cycloon, Liseta e Fambo apresentaram maior resistência horizontal e Achat, Bintje, Felsina e Victoria, maior resistência vertical para alguns isolados. O índice SIA (Capacidade interação específica) mostrou a existência de variabilidade na agressividade e virulência dos isolados de PVY testados.

---

<sup>1</sup> Comitê de orientação: Antonia dos Reis Figueira (orientadora) e Alessandra de Jesus Boari (co-orientadora).

## 2 ABSTRACT

MORAES, Flávio Henrique Reis. Biological and serological comparison of the *Potato Virus Y* (PVY) isolates and test diallel using 17 of potato cultivars In: \_\_\_\_\_ . **Characterization of isolates of the *Potato virus Y* (PVY) from potato in Brazil.** 2003. p.34-64. Thesis (Master in Phytopathology) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.<sup>1</sup>

This work was carried out with 20 isolates of PVY (11 PVY<sup>N</sup> and 09 PVY<sup>O</sup>) detected in potato (*S. tuberosum* L.) tubers from several Brazilian potato crops. After being tested by DAS-ELISA, using policlonal antibodies, the PVY isolates were inoculated in 15 species of host plants. The necrotic isolates were tested again by DAS-ELISA using monoclonal antibodies for PVY<sup>N</sup>. Four isolates were chosen and inoculated in 17 cultivars of potato in order to investigate the symptoms and perform a partial diallel studies. The symptoms showed by the host plants presented high variability when infected with the necrotic isolates, a small variability when infected with YO-07Mg and no variability with the others common isolates. Based on the symptoms showed by tobacco (*N. tabacum*) cvs. Turkish, Turkish NN (TNN), and Havana, *N. glutinosa*, *N. rustica* and *P. floridana*, the necrotic isolates were divided in three groups: group I (Br-Mg, Br2-MG, 404Sp and 45-5) showed milder symptoms in *Nicotiana* and severe symptoms in *Physalis*; group II (UFLA, Mg1, 21Sp, 22Sp, Velox21 and Cris01) showed more severe symptoms in *Nicotiana* species and mosaic in *Physalis*; group III (Cris02) showed severe symptoms in tobacco cvs. Turkish and TNN and symptoms similar to those shown by the group I in the other inoculated hosts. The isolates YNBr-Mg and YNBr2-Mg when tested by DAS-ELISA using monoclonal antibodies against PVY<sup>N</sup> (Cat # 26000 and 26001) did not react with the first and showed a weak reaction with the second antibody. The isolates YN404Sp e YN45-5, in opposite way, didn't react with second monoclonal antibody and showed a weak reaction with the first one. The majority of potato cultivars inoculated with the four PVY isolates reacted with mosaic, however some of them showed also necrotic reaction as necrotic rings, veins necrosis, stem necrosis and hypersensitiveness response. The analysis of partial diallel showed variability in the horizontal and vertical resistances of potato cultivars and also in the aggressiveness and virulence of the PVY isolates. Glycloon, Liseta and Fambo cultivars presented higher horizontal resistance and. Achat, Bintje, Felsina and Victoria presented higher vertical resistance for some isolates. The index SIA (Specific interaction ability), showed the existence of great variability in the aggressivity and virulence of those isolated of PVY.

---

<sup>1</sup> Guidance Committee: Antonia dos Reis Figueira (Adviser); Alessandra de Jesus Boari (co-adviser).

### 3 INTRODUÇÃO

O vírus Y da batata (*Potato virus Y* - PVY), membro tipo do gênero *Potyvirus*, tem sido responsável por perdas significativas na cultura da batata em vários países. No Brasil, a sua ocorrência nos campos comerciais de produção de sementes de batata era considerada, até meados de 1995, como bastante rara ou ocasional, sendo que o vírus do enrolamento da folha (*Potato leafroll virus*-PLRV) era praticamente o único responsável pelas perdas relacionadas com doenças viróticas. Entretanto, com a constante importação de sementes de países da Europa, dos Estados Unidos e Canadá, novas estirpes do PVY, têm sido introduzidas, de modo que atualmente esse vírus tem uma importância igual, e em alguns casos maior do que o PLRV (Figueira & Pinto, 1995; Figueira et al., 1996; Moraes et al., 1999; Souza Dias et al., 1995; 1996).

Existem três grupos clássicos de estirpes, cuja diferenciação se baseia nos sintomas causados em plantas de fumo e na sua transmissibilidade pelo vetor: estirpe comum ou PVY<sup>O</sup>, causa apenas mosaico sistêmico; estirpe necrótica ou PVY<sup>N</sup>, causa mosaico e necrose nas nervuras; e o PVY<sup>C</sup> que induz sintomas do tipo “stipple streak”, em alguns cultivares de batata que possuem o gene *Nc* (De Bokx & Huttinga, 1981). Entretanto, nos últimos anos, têm surgido vários isolados com sintomas diferentes daqueles que são considerados típicos, para cada uma das estirpes de PVY (Beczner et al., 1984; Jones, 1990; Chrzanowska, 1991; McDonald & Singh, 1996; Figueira et al., 1996), sendo alguns comprovadamente recombinantes (Revers et al. 1996; Moury et al., 2002; Glais et al., 2002).

A identificação das estirpes do PVY através da inoculação em plantas indicadoras é de grande relevância para a diagnose de fitovírus, mas existe a necessidade de se trabalhar com vários isolados de PVY para se ter uma ampla

## 4 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).

### 4.1 Obtenção, purificação e armazenamento dos isolados de PVY

Os isolados de PVY (Tabela 1) foram obtidos a partir de tubérculos infectados detectados em lotes de batata semente e consumo, provenientes de diversas regiões do Brasil e de sementes importadas, que foram enviadas ao Centro de Indexação de Vírus do Estado de Minas Gerais, lotado no DFP/UFLA, para análise. Três destes isolados (YO-07, YN-UFLA e YNBr) foram estudados anteriormente por Moraes et al. (1999). Todos foram inicialmente diagnosticados por DAS-Elisa e em seguida inoculados em plântulas de fumo (*Nicotiana tabacum* L.) 'TNN', *Physalis floridana* Rybd, *Datura stramonium* L. e *Gomphrena globosa* L., para verificação de possíveis infecções mistas e classificação em PVY<sup>O</sup> ou PVY<sup>N</sup>. A purificação biológica dos isolados foi feita inoculando-se mecanicamente extrato de tecidos, com lesões locais individuais de *Chenopodium quinoa* Willd., *C. amaranticolor* Coste & Reyn. e/ou *P. floridana*, em plantas de fumo 'TNN'. Após o aparecimento dos sintomas, as plantas foram submetidas à inspeção visual e à transmissão pelo vetor *Myzus persicae* Sulz.

O isolado YNBr2-Mg foi obtido a partir de algumas plantas de *Physalis* que, quando inoculadas com o isolado original YNBr-Mg, apresentaram sintomas mais severos do que os observados anteriormente. Este foi purificado biologicamente utilizado como um isolado à parte e introduzido nos demais estudos. O isolado original, YNBr-Mg, manteve as suas propriedades biológicas e sorológicas inalteradas.

### 3 INTRODUÇÃO

O vírus Y da batata (*Potato virus Y* - PVY), membro tipo do gênero *Potyvirus*, tem sido responsável por perdas significativas na cultura da batata em vários países. No Brasil, a sua ocorrência nos campos comerciais de produção de sementes de batata era considerada, até meados de 1995, como bastante rara ou ocasional, sendo que o vírus do enrolamento da folha (*Potato leafroll virus*-PLRV) era praticamente o único responsável pelas perdas relacionadas com doenças viróticas. Entretanto, com a constante importação de sementes de países da Europa, dos Estados Unidos e Canadá, novas estirpes do PVY, têm sido introduzidas, de modo que atualmente esse vírus tem uma importância igual, e em alguns casos maior do que o PLRV (Figueira & Pinto, 1995; Figueira et al., 1996; Moraes et al., 1999; Souza Dias et al., 1995; 1996).

Existem três grupos clássicos de estirpes, cuja diferenciação se baseia nos sintomas causados em plantas de fumo e na sua transmissibilidade pelo vetor: estirpe comum ou PVY<sup>O</sup>, causa apenas mosaico sistêmico; estirpe necrótica ou PVY<sup>N</sup>, causa mosaico e necrose nas nervuras; e o PVY<sup>C</sup> que induz sintomas do tipo “stipple streak”, em alguns cultivares de batata que possuem o gene *Nc* (De Bokx & Huttinga, 1981). Entretanto, nos últimos anos, têm surgido vários isolados com sintomas diferentes daqueles que são considerados típicos, para cada uma das estirpes de PVY (Beczner et al., 1984; Jones, 1990; Chrzanowska, 1991; McDonald & Singh, 1996; Figueira et al., 1996), sendo alguns comprovadamente recombinantes (Revers et al. 1996; Moury et al., 2002; Glais et al., 2002).

A identificação das estirpes do PVY através da inoculação em plantas indicadoras é de grande relevância para a diagnose de fitovírus, mas existe a necessidade de se trabalhar com vários isolados de PVY para se ter uma ampla

noção a respeito da variabilidade desses, especificamente na cultura da batata. Aliados a estudos moleculares, os sintomas induzidos em diversas indicadoras podem caracterizar melhor os isolados e fornecer subsídios para a tomada de medidas de controle desses vírus no campo. Estudos sorológicos também podem auxiliar na discriminação entre estirpes. Os anticorpos policlonais oriundos da região da proteína da capa não discriminam as diferentes estirpes de PVY (Rose et al., 1987), mas os monoclonais podem diferenciar parcialmente os grupos PVY<sup>OC</sup> e PVY<sup>N</sup> (Gugerli & Fries, 1983; Ohshima et al., 1991; 1992; Singh et al., 1993, Ounouna et al., 2002).

Devido ao tipo de interação do vírus com a planta, os métodos de controle para doenças viróticas devem ser essencialmente de caráter preventivo. O uso de cultivares resistentes ou tolerantes, ao vírus e/ou ao vetor, tem sido considerado como uma das medidas de controle mais eficientes. Diversas cultivares de batata apresentam diferentes níveis de resistência ao PVY (Santos et al., 1986; NIVAA, 2000), que variam de acordo com a pressão do inóculo e do vetor, com as condições climáticas, idade e com o genótipo da planta (De Bokx & Huttinga, 1981; Le Romancer & Nedellec, 1997). Geralmente, esses níveis são estabelecidos para o país de origem da batata-semente, de onde o Brasil costuma importar, como o Canadá e países europeus, e depois são extrapolados para às nossas condições climáticas de país tropical, portanto totalmente diferentes. Desse modo, o conhecimento de como os alelos de resistência da hospedeira interagem com os alelos de virulência do patógeno é de fundamental importância, para embasar a adoção de novas estratégias de melhoramento genético visando a obtenção de cultivares resistentes (Melo & Santos, 1999).

Uma das maneiras de se obter informações sobre a resistência vertical e horizontal do hospedeiro, bem como sobre a agressividade e virulência do patógeno, em casos de interações poligênicas, é através do método dos

dialelos parciais, modelo IV de Griffing, em que todos os materiais são cruzados entre si. Uma versão modificada, mais simples, para essa metodologia foi desenvolvida por Melo & Santos (1999), tendo se mostrado bastante eficiente para a seleção de genótipos portadores de resistência. Nessa versão faz-se a formação de dois grupos, um de hospedeiros e o outro de patógenos, e se estima a capacidade geral de reação (GRA), que representa a resistência horizontal do hospedeiro, a capacidade geral de agressividade (GAA), que indica os níveis de agressividade do patógeno, e a capacidade específica de interação (SIA), que indica a resistência vertical da planta e a virulência do patógeno.

Este trabalho teve como objetivo estudar a variabilidade de um grupo de 20 isolados de PVY, através da observação da sintomatologia por eles induzidos em diversas plantas indicadores, e da sua reação sorológica, utilizando o teste DAS-Elisa com um antissoro policlonal e dois monoclonais, específicos para PVY<sup>N</sup>. Numa etapa posterior, quatro desses isolados, considerados representativos do grupo estudado, foram inoculados em 17 cultivares de batata, para obter informações sobre a diversidade dos isolados e dos níveis de resistência e/ou suscetibilidade das cultivares testadas, visando indicar os genótipos de resistência mais adequados para serem utilizados em programas de melhoramento de batata no Brasil.



## 4 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).

### 4.1 Obtenção, purificação e armazenamento dos isolados de PVY

Os isolados de PVY (Tabela 1) foram obtidos a partir de tubérculos infectados detectados em lotes de batata semente e consumo, provenientes de diversas regiões do Brasil e de sementes importadas, que foram enviadas ao Centro de Indexação de Vírus do Estado de Minas Gerais, lotado no DFP/UFLA, para análise. Três destes isolados (YO-07, YN-UFLA e YNBr) foram estudados anteriormente por Moraes et al. (1999). Todos foram inicialmente diagnosticados por DAS-Elisa e em seguida inoculados em plântulas de fumo (*Nicotiana tabacum* L.) 'TNN', *Physalis floridana* Rybd, *Datura stramonium* L. e *Gomphrena globosa* L., para verificação de possíveis infecções mistas e classificação em PVY<sup>O</sup> ou PVY<sup>N</sup>. A purificação biológica dos isolados foi feita inoculando-se mecanicamente extrato de tecidos, com lesões locais individuais de *Chenopodium quinoa* Willd., *C. amaranticolor* Coste & Reyn. e/ou *P. floridana*, em plantas de fumo 'TNN'. Após o aparecimento dos sintomas, as plantas foram submetidas à inspeção visual e à transmissão pelo vetor *Myzus persicae* Sulz.

O isolado YNBr2-Mg foi obtido a partir de algumas plantas de *Physalis* que, quando inoculadas com o isolado original YNBr-Mg, apresentaram sintomas mais severos do que os observados anteriormente. Este foi purificado biologicamente utilizado como um isolado à parte e introduzido nos demais estudos. O isolado original, YNBr-Mg, manteve as suas propriedades biológicas e sorológicas inalteradas.

TABELA 1. Origem e características dos isolados do vírus Y da batata (PVY), utilizados no trabalho. UFLA, Lavras-MG, 2003.

Isolado	Planta hospedeira	ORIGEM		Classificação
			Local (Ano)	
YO-07Mg	Batata 'Achat'		Itajubá-MG (1996)	PVY <sup>O</sup>
YOATLMg	Batata 'Atlantic'		Paraguaçu-MG (1999)	PVY <sup>O</sup>
YOATLSG	Batata 'Atlantic'		São Gortado-MG (1999)	PVY <sup>O</sup>
YO229Sp	Batata 'Atlantic'		São Paulo-SP. Básica do Canadá (1999)	PVY <sup>O</sup>
YO-01Sp	Batata 'Atlantic'		Fran. Importada - SP (1999)	PVY <sup>O</sup>
YO-08Sp	Batata 'Bintje'		Takao Hoshino - SP (1999)	PVY <sup>O</sup>
YO-28Sp	Batata Monalisa		Takao Hoshino - SP (1999)	PVY <sup>O</sup>
YO-419Mg	Batata 'Monalisa'		Cambuí-MG (1999)	PVY <sup>O</sup>
YO199-29	Batata 'Achat'		Maria da Fé - MG (1995)	PVY <sup>O</sup>
YN-UFLA	Batata		Sul de Minas Gerais (1987). Coleção DFP/UFLA	PVY <sup>N</sup>
YNBr-Mg	Batata 'Achat'		Itajubá-MG (1996)	PVY <sup>N</sup>
YNBr2-Mg	Batata 'Achat'		Mecanicamente obtido do YNBr-Mg (2000)	PVY <sup>N</sup>
YN404Sp	Batata 'Mondial'		Capão Bonito - SP (1999). Cultura de tecidos	PVY <sup>N</sup>
YN-Mg1	Batata 'Bintje'		Tiros - MG (1999). Cultura de tecidos	PVY <sup>N</sup>
YN-21Sp	Batata 'Monalisa'		Takao Hoshino - SP (1999)	PVY <sup>N</sup>
YN-22SP	Batata 'Jactte Bintje'		José Furtado - SP (1999)	PVY <sup>N</sup>
YN45-5	Batata "Achat"		Maria da Fé - MG (1995)	PVY <sup>N</sup>
YNCris01	Batata "J. Bintje"		Cristalina - GO (2000)	PVY <sup>N</sup>
YNCris02	Batata "J. Bintje"		Cristalina - GO (2000)	PVY <sup>N</sup>
YNVelox21	Batata "Velox"		Três Corações - MG (1999). Básica Alemanha	PVY <sup>N</sup>

Para a preservação do inóculo, folhas com sintomas característicos foram repicadas e desidratadas em um dessecador de vidro, contendo sílica gel. Este material foi mantido em câmara fria (10°C) e armazenado em pequenos frascos de vidro, também com sílica, em congelador a -20°C. Quando necessário, estes foram inoculados em plantas de fumo 'TNN', sob condições de casa-de-vegetação, para multiplicação.

#### 4.2 Teste de gama de hospedeiras

As plantas hospedeiras e/ou indicadoras foram obtidas através de semeadura em bandejas de isopor, sendo transplantadas, ao atingirem o tamanho ideal, para vasos com capacidade de 2 kg, contendo, como substrato, terra, areia e esterco fumigados, na proporção 2:1:1, e então mantidas em casa-de-vegetação.

As espécies testadas foram: *G. globosa*, *C. quinoa*, *C. amaranticolor*, *D. stramonium*, *Nicandra physaloides* Gaertn., *N. tabacum* cvs. Turkish, Turkish NN (TNN), Havana e White Burley, *N. rustica*, *N. glutinosa*, *N. Bentamiana*, *P. floridana*, *Lycopersicon esculentum* Mill. Cv. Stª Clara e *Capsicum annum* L., cv Agronômico 10G.

Plântulas com três a quatro folhas definitivas foram inoculadas mecanicamente, utilizando-se extratos obtidos de folhas de plantas de fumo infectadas, na proporção de 1:10 (p/v) em tampão fosfato 0,01M, pH 7, contendo sulfito de sódio 0,01M. Este extrato foi friccionado com algodão umedecido nas folhas das plantas sadias, previamente polvilhadas com carborundum (500 a 600 mesh), mantendo-se as mãos protegidas por luvas para evitar a contaminação entre os isolados. Posteriormente, as plantas foram mantidas em casa de vegetação até a fase final de avaliação dos sintomas. Foi registrado o início do surgimento dos sintomas, em dias após inoculação, acompanhando-se diariamente a evolução destes no decorrer de um mês, aproximadamente. As tentativas de recuperação do vírus, a partir de plantas inoculadas sem sintomas, foram feitas por inoculação mecânica do seu extrato em plantas de fumo cv. 'TNN' e por DAS-Elisa.

#### **4.3 Teste sorológico DAS-Elisa utilizando anti-soros policlonal (PVY) e monoclonal (PVY<sup>N</sup>).**

Os isolados foram submetidos ao teste sorológico DAS-Elisa, utilizando-se um anti-soro policlonal para PVY (Boehringer Mannheim-Alemanha) e dois monoclonais para PVY<sup>N</sup> (Agdia 26000 e 26001-USA). O teste Elisa foi realizado como descrito por Clark & Adams (1977). Os tampões utilizados foram: de cobertura (carbonato-bicarbonato 0,025M, pH 9,6, contendo 0,2 g/l de azida de sódio), de extração da amostra (fosfato salino, PBS, pH 7,4, contendo 0,05% de Tween-20 e 2% de polivinilpirrolidona-PVP), do conjugado (PBS, contendo 0,1% de leite em pó desnatado e 0,1% de Tween-20), do substrato (dietanolamina, pH 9,8

contendo 0,02% de azida sódica) e lavagem (PBS contendo 0,05% de Tween-20). Utilizaram-se microplacas padrão, da Costar (USA) com 96 orifícios. Foram consideradas positivas as amostras cujas absorvâncias foram maiores ou iguais a duas vezes a média de absorvância do controle negativo.

#### 4.4 Teste de Dialelo parcial

Quatro isolados de PVY, sendo dois necróticos (YNBr2-Mg e YN-Mg1) e dois comuns (YOATLMg e YO-07Mg), foram mecanicamente inoculados em 17 cultivares de batata: Accord (-), Achat (R), Ágata (9), Asterix (6), Baraka (R, 8), Bintje (6), Cycloon (9), Fambo (9), Felsina (6), Kennebec (8), Lady Olympia (8,5), Liseta (8,5), Mondial (7,5), Remarka (8), Shepody (-), Victoria (6,5) e Vivaldi (9) (R: resistente, segundo Santos et al., 1986; 3-9: escala de nota segundo o catálogo holandês do NIVAA, 2000; - : não classificada).

Plantas de batata foram obtidas através do plantio de tubérculos previamente submetidos a forçamento de brotação com bissulfureto de carbono (25 ml/m<sup>3</sup>) por 72h, seguido de imersão em solução de ácido giberélico (5 ppm) por 5 minutos e posterior plantio em vasos de 5kg contendo o substrato já citado. Cinco dias após a emergência, todas as plantas foram submetidas ao teste sorológico DAS-Elisa, para verificar a sanidade da planta. 10 dias após a emergência, essas foram desbastadas, deixando-se uma haste por planta, inoculadas mecanicamente com extrato das folhas de fumo infectadas, com os respectivos isolados, e mantidas em casa-de-vegetação.

O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado (DIC), em fatorial 4x17, com quatro repetições. As análises visuais foram realizadas a cada dois dias após a inoculação, até o final do ciclo da batata. O teste sorológico DAS-Elisa quantitativo (1:10) foi realizado aos 35 dias após a inoculação. Os dados obtidos foram utilizados na análise de resistência pelo método de Dialelo Parcial modelo IV de Griffing, sugerido por Melo &

---

mosqueado; ALF – afilamento do limbo foliar; PCN – pontos cloróticos seguido de necrose; AN- anéis necróticos; DEF – desfolha; ÑDEF – não desfolha. Sintomas : + fraco, ++ intermediário e +++ severo. 2/ 0 = ausência de sintomas. 3/ 0/0 = ausência de sintomas na planta e na reinoculação em fumo. 4/ S/S = Infecção Latente (sem sintomas na planta, mas positivo em DAS-ELISA).

De Aquino et al. (1995) concluíram que isolados de PVY, provenientes de pimentão, são distintos dos isolados oriundos de outras espécies de hospedeiras. Entretanto, Blanco-Urgoiti et al. (1998) observaram que alguns isolados de PVY<sup>C</sup>, além de serem transmitidos por afídeos, também infectaram pimentão cv. Yolo Wonder. Fakhfakh et al. (1995) detectaram um isolado oriundo de pimentão como sendo pertencente ao grupo de estirpes PVY<sup>O</sup> e, recentemente, Truta (2002) comparando a reação sorológica de isolados de PVY oriundos de pimentão e pimenta com dois isolados de PVY da batata, aqui estudados (YNBR-Mg e o YO229Sp), observou que estes apresentaram um alto relacionamento com o isolado grupo necrótico e nenhum relacionamento sorológico com o isolado do grupo comum. A autora também observou que três isolados foram capazes de infectar a batata, sendo que um de pimentão causou sintomas de mosaico, e os demais (um de pimentão e outro de pimenta) não causaram sintomas, infectando de modo latente.

TABELA 2. Sintomas induzidos em diversas hospedeiras por 20 isolados de PVY. UFLA, Lavras-MG, 2003.

PVY Isolados	SINTOMAS INDUZIDOS									
	C. amaranticolor	C. quinoa	Fumo 'TNN'	'Turkish'	'Havana'	'W. burley'	N. rustica	N. glutinosa	P. floridana	
YnBr-Mg	1/2 LCL-LNL+	0 <sup>0</sup>	NN-M-ER ++	NN-M +	M-NN +	NN-ER ++	0/0 <sup>0</sup>	CN-Mo +	M-AN-NN-DEF ++	
YnBr2-Mg	LNL+	0	NN-M-ER ++	NN-M +	M-NN +	NN-ER ++	0/0	CN-Mo +	M-AN-NN-DEF ++	
Yn404Sp	Clol+	0	NN-M-ER +	NN-M +	M-NN +	NN-ER ++	0/0	CN-Mo +	M-AN-NN-DEF ++	
Yn45-5	0	0	NN-M-ER +	NN-M +	M-NN +	NN-ER ++	0/0	CN-Mo +	M-AN-NN-DEF ++	
YnCr02	0	0	NN-M-ER +++	NN-M +++	M-NN +	NN-ER ++	0/0	CN-Mo ++	M-AN-NN-DEF ++	
YnUFLA	LNL+	LCL +	NN-M-ER +++	NN-M +++	M-NN +	NN-ER +	M-ER ++	CN-Mo-ER +++	M-Bol-ER ++ ÑDEF	
YnMg1	0	0	NN-M-ER +++	NN-M +++	M-NN +++	NN-ER +++	S/S <sup>0</sup>	CN-Mo-ER +++	M-Bol-ER +++ ÑDEF	
Yn21Sp	0	0	NN-M-ER +++	NN-M +++	M-NN +++	NN-ER +++	M +	CN-Mo-ER +++	M-Bol-ER ++ ÑDEF	
Yn22Sp	0	0	NN-M-ER +++	NN-M ++	M-NN +++	NN-ER +++	M +	CN-Mo-ER +++	M-Bol-ER ++ ÑDEF	
YnVelox21	Clol ++	LCL+	NN-M-ER +++	NN-M +++	M-NN +++	NN-ER +++	M +	CN-Mo-ER +++	M-Bol-ER +++ ÑDEF	
YnCr01	Clol+	LCL +	NN-M-ER +++	NN-M +++	M-NN +++	NN-ER +++	M +	CN-Mo-ER +++	M-Bol-ER ++ ÑDEF	
Yo07Mg	LCL, LNL+	LCL+	CN-M-PCN++	CN-M-PCL +	M-PCN +	CN-M-PCN++	M-ER ++	CN-Mo ++	M-PCN-DEF+++	
YoATLMg	LNL++	0	CN-M-PCN++	CN-M-PCL +	M-PCL +	CN-M-PCL+	M+	CN-Mo ++	M-PCN-DEF+++	
YoATLSG	LNL+	0	CN-M ++	CN-M-PCL +	M-PCL +	CN-M-PCL+	0/0	CN-Mo ++	M-PCN-DEF++	
Yo199-29	0	LNL+	CN-M +	CN-M-PCL +	M-PCL +	CN-M-PCN++	S/S	CN-Mo ++	M-PCN-DEF+++	
Yo419Mg	LCL-LNL++	LNL++	CN-M ++	CN-M-PCL ++	M-PCL +	CN-M-PCL+	0/0	CN-Mo ++	M-PCN-DEF++	
Yo229Sp	LNL++	LNL+	CN-M +	CN-M-PCL ++	M-PCL +	CN-M-PCL+	M-ER +	CN-Mo ++	M-PCN-DEF+++	
Yo01Sp	0	LCL-LNL++	CN-M +	CN-M-PCL +	M-PCL +	CN-M-PCL+	S/S	CN-Mo ++	M-PCN-DEF++	
Yo08Sp	LNL++	LCL++	CN-M +	CN-M-PCL +	M-PCL +	CN-M-PCL+	S/S	CN-Mo ++	M-PCN-DEF++	
Yo28Sp	0	0	CN-M ++	CN-M-PCL +	M-PCL +	CN-M-PCL+	M +	CN-Mo ++	M-PCN-DEF+++	

YNUFLA) e cinco comuns (YO-07Mg, YOATLMg, YOATLSG, YO229Sp e YO-08Sp) induziram o aparecimento de lesões cloróticas e/ou necróticas semelhantes. Os demais isolados necróticos (YN404Sp, YnVelox21 e YnCr01) induziram sintomas de clorose interneval nessas plantas, aos 26 dias pós-inoculação (DPI) (Tabela 2). É interessante salientar que os mesmos cinco isolados necróticos e o comum YO28Sp, que não induziram sintomas em *C. amaranticolor*, também não causaram lesões necróticas em *C. quinoa* Willd. Outros três isolados necróticos (YnBr-Mg, YnBr2-Mg e Yn404Sp) e dois comuns (YOATLMg e YOATLSG) apresentaram as mesmas características de não formação de lesões nessa *Chenopodiaceae*.

Na tabela 2, também observa-se que, dentre os isolados necróticos, apareceram três grupos distintos (I, II e III) avaliados quanto à intensidade e à velocidade de desenvolvimento dos sintomas em *Nicotiana glutinosa* e nas cultivares de fumo, exceto 'W. burley', quanto ao aparecimento de necrose e desfolha em *P. floridana* (Figura 1), e também pelas características de suscetibilidade/resistência mostradas por *N. rustica*. O grupo III foi constituído apenas pelo isolado YnCr02, apresentando características pertinentes ao grupo I e II, dependendo da indicadora. Resultados semelhantes foram observados na reação sorológica, pelo teste DAS-Elisa, ao dois anticorpos monoclonais (Agdia-USA - 26000 e 26001), específicos para a estirpe necrótica (Figura 2).

O primeiro grupo (I), formado pelos isolados necróticos YnBr-Mg,



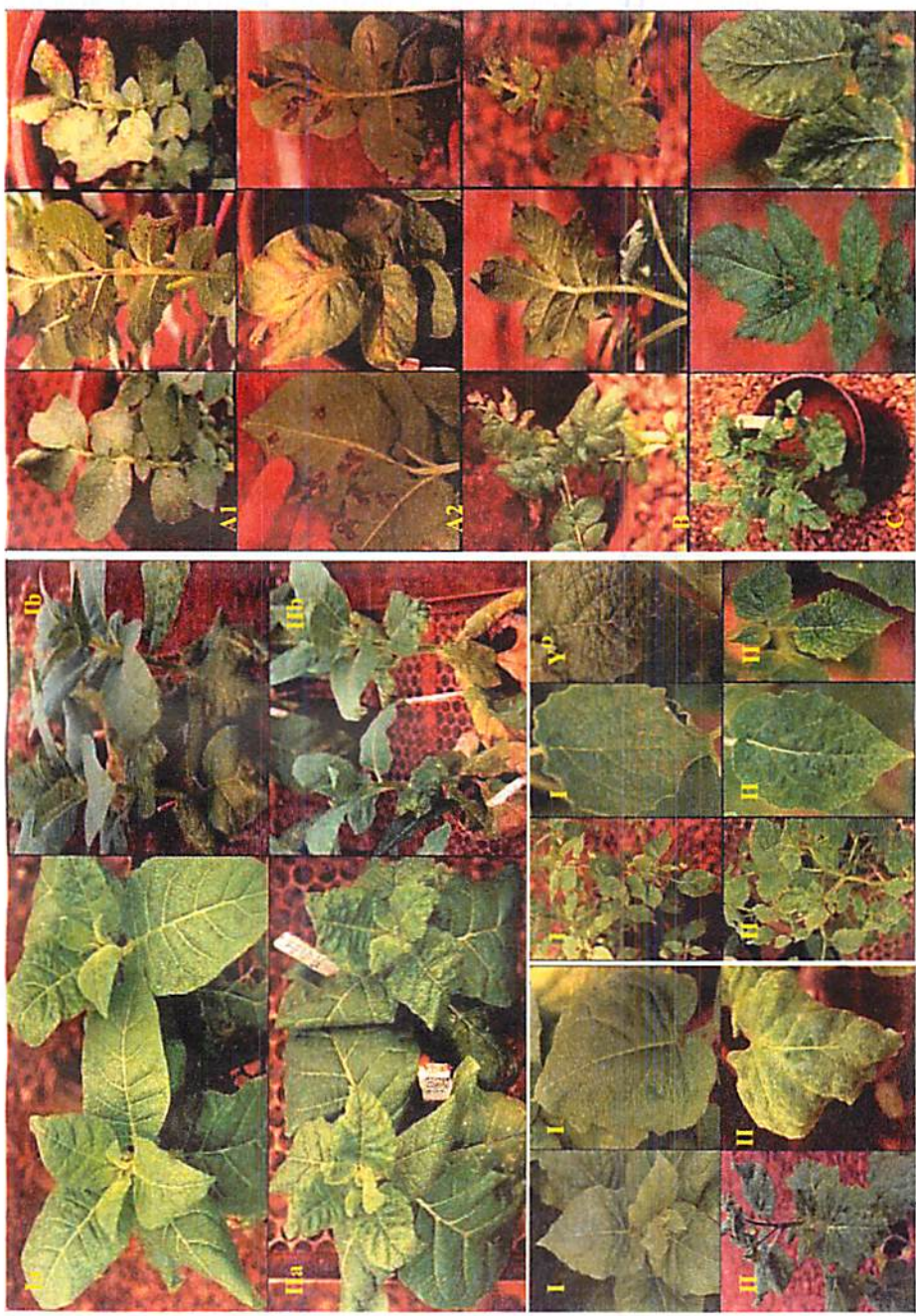


FIGURA 1: Ver título na próxima página...

No teste DAS-Elisa (Figura 2), utilizando os anticorpos monoclonais específicos para PVY<sup>N</sup> (26000 e 26001, Agdia - USA), a exemplo do que foi observado na sintomatologia (Tabela 2), os isolados necróticos foram divididos em três grupos; entretanto, o grupo I pode ainda ser subdividido em dois subgrupos (A e B). No subgrupo IA, os isolados Br-Mg e Br2-Mg apresentaram reação negativa para o anticorpo 26000 e reação positiva, ainda que muito fraca, próxima a duas vezes a média do controle, para o anticorpo 26001. Já o subgrupo IB apresentou reações totalmente inversas. O isolado YNCris02 (grupo III) apresentou reação muito fraca e os isolados do grupo II reagiram positivamente para ambos os anticorpos monoclonais.

Anticorpos policlonais, oriundos da região da proteína da capa, não discrimina os diferentes grupos de estirpes de PVY (Rose et al., 1987). A utilização de anticorpos monoclonais, que podem ser produzidos a partir de polipeptídeos sintéticos para as regiões C-terminal (Oshima et al., 1992) e N-terminal da capa (Ounouna et al., 2002) permite a diferenciação, em parte, dos grupos PVY<sup>O</sup>, PVY<sup>C</sup> e PVY<sup>N</sup> (Gugerli & Fries, 1983; Sanz et al., 1990; Oshima et al., 1990; Singh et al., 1993), porém alguns isolados revelaram diferenças sorológicas dentro do mesmo grupo (Ellis et al., 1996; Cerovska, 1998; Boonham & Barker, 1998).

Vários são os relatos de isolados de PVY, apresentando características biológicas e/ou sorológicas atípicas diferentes daquelas observadas para os isolados ditos padrão (Beczner et al., 1984; Jones, 1990; Chrzanowska, 1991; 1994; De Aquino et al. 1995; McDonald & Singh, 1996; Figueira et al., 1996; McDonald et al., 1997; Moraes et al., 1999). Chrzanowska (1991; 1994) relatou a ocorrência de um novo isolado de PVY<sup>N</sup>, detectado em 1984, na cv. 'Wilga', em campos do nordeste da Polônia, em altas concentrações, com alta disseminação e mais infectivo em plantas de batata, induzindo sintomas suaves da doença, em comparação com os isolados previamente conhecidos, e não

Entre os isolados pertencentes ao grupo comum, poucas diferenças foram observadas, com exceção do YO-07Mg, que apresentou sintomas mais fortes em *N. rustica* e em fumo (cvs. TNN, Havana e White Burley), caracterizados pelo aparecimento de alguns pontos cloróticos, que evoluíram para necrose. Nesse grupo, os sintomas induzidos variaram desde mosaico e enrugamento, como observado para YO-07Mg e YO229Sp, passando para mais leve com os isolados YOATLMg e YO28Sp, latentes para YO199-29, YO-01Sp e YO-08Sp e ausentes para YOATLSG e YO419Mg.

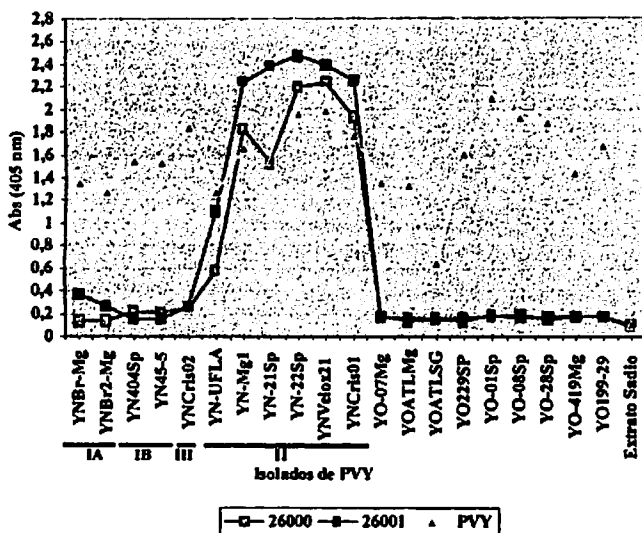


FIGURA 2. Absorvância (405 nm) média de quatro plantas de fumo “TNN”, com três repetições obtida através do teste DAS-ELISA, aos 15 DPI, para diferentes isolados de PVY, utilizando anticorpos policlonais (PVY-Bioreba) e monoclonais específicos para PVY<sup>N</sup> (26000 e 26001- Agdia-USA). Leitura realizada após 1 hora de incubação com substrato. UFLA, Lavras-MG, 2003.



No teste DAS-Elisa (Figura 2), utilizando os anticorpos monoclonais específicos para PVY<sup>N</sup> (26000 e 26001, Agdia - USA), a exemplo do que foi observado na sintomatologia (Tabela 2), os isolados necróticos foram divididos em três grupos; entretanto, o grupo I pode ainda ser subdividido em dois subgrupos (A e B). No subgrupo IA, os isolados Br-Mg e Br2-Mg apresentaram reação negativa para o anticorpo 26000 e reação positiva, ainda que muito fraca, próxima a duas vezes a média do controle, para o anticorpo 26001. Já o subgrupo IB apresentou reações totalmente inversas. O isolado YNCris02 (grupo III) apresentou reação muito fraca e os isolados do grupo II reagiram positivamente para ambos os anticorpos monoclonais.

Anticorpos policlonais, oriundos da região da proteína da capa, não discrimina os diferentes grupos de estirpes de PVY (Rose et al., 1987). A utilização de anticorpos monoclonais, que podem ser produzidos a partir de polipeptídeos sintéticos para as regiões C-terminal (Oshima et al., 1992) e N-terminal da capa (Ounouna et al., 2002) permite a diferenciação, em parte, dos grupos PVY<sup>O</sup>, PVY<sup>C</sup> e PVY<sup>N</sup> (Gugerli & Fries, 1983; Sanz et al., 1990; Oshima et al., 1990; Singh et al., 1993), porém alguns isolados revelaram diferenças sorológicas dentro do mesmo grupo (Ellis et al., 1996; Cerovska, 1998; Boonham & Barker, 1998).

Vários são os relatos de isolados de PVY, apresentando características biológicas e/ou sorológicas atípicas diferentes daquelas observadas para os isolados ditos padrão (Beczner et al., 1984; Jones, 1990; Chrzanowska, 1991; 1994; De Aquino et al. 1995; McDonald & Singh, 1996; Figueira et al., 1996; McDonald et al., 1997; Moraes et al., 1999). Chrzanowska (1991; 1994) relatou a ocorrência de um novo isolado de PVY<sup>N</sup>, detectado em 1984, na cv. 'Wilga', em campos do nordeste da Polônia, em altas concentrações, com alta disseminação e mais infectivo em plantas de batata, induzindo sintomas suaves da doença, em comparação com os isolados previamente conhecidos, e não

foram poucos pontos cloróticos nas folhas inoculadas e mosaico sistêmico, variando de leve a intenso. As interações necróticas características do grupo B só foram observadas para o isolado YOATLMg nas cultivares Achat, Fambo e Lady Olympia; os demais sintomas necróticos apresentaram características do grupo A (Figuras 1 – A1, A2 e B).

O mosaico de várias intensidades é o sintoma de infecção sistêmica mais comum induzido por isolados de PVY em diferentes cultivares de batata (De Bokx & Huttinga, 1981). Os sintomas causados por esse vírus geralmente variam com os fatores ambientais, como a temperatura (De Bokx & Piron, 1977), e com o genótipo da cultivar e/ou genótipo do isolado (Le Romancer & Nedellec, 1997). As cultivares Achat e Lady Olympia apresentaram sintomas necróticos para os quatro isolados, sendo que o sintoma de necrose letal da folha só foi observado para o isolado YOATLMg, pois os demais induziram, no máximo, a morte de folíolos (Figura 1-B). A cultivar Fambo apresentou reação necrótica aos isolados YN Br2-Mg e YOATLMg e sintomas de mosaico (reação sistêmica) para os outros dois isolados, YN-Mg1 e YO-07Mg. As demais reações necróticas foram observadas em Asterix, Bintje e Kennebec, inoculados com o isolado YO-ATLMg, e na cultivar Shepody, inoculada com o isolado YO-07Mg. Entre os isolados estudados, o YO-ATLMg foi o que induziu sintomas necróticos na maioria das cultivares com ele inoculados.

### **5.3 Análise de Dialelo Parcial**

A análise de variância das médias das diferentes concentrações, obtidas através do teste DAS-Elisa (Anexo A, tabela 1) utilizando-se o teste do Scott-knot, mostrou efeito significativo para os isolados, para as cultivares e para a interação entre cultivares e isolados, indicando variabilidade entre os tratamentos. Conforme os dados, a análise dialélica (Anexo A, tabela 2) mostrou alta significância da GRA e GAA, indicando que as cultivares de batata possuem

diferentes níveis de resistência horizontal e que os isolados possuem diferentes níveis de agressividade. Os valores de significância da SIA confirmaram a existência de interação entre os isolados de PVY e as cultivares de batata, significando que esses cultivares também apresentam diferenças quanto a resistência vertical. Além disso, mostraram que existe variabilidade na virulência desses isolados.

Os dados da capacidade geral de reação (GRA) (Figura 3) mostraram que as cultivares Cycloon, Liseta e Fambo apresentaram os maiores potenciais de resistência horizontal (GRA negativo), seguidos, em ordem decrescente, pela Accord, Kennebec, Asterix, L. Olympia e Achat. Ao contrário, Victoria, Mondial e Vivaldi apresentaram baixos potenciais de resistência horizontal (GRA positivo), em ordem decrescente, seguidos pela Baraka e Bintje.

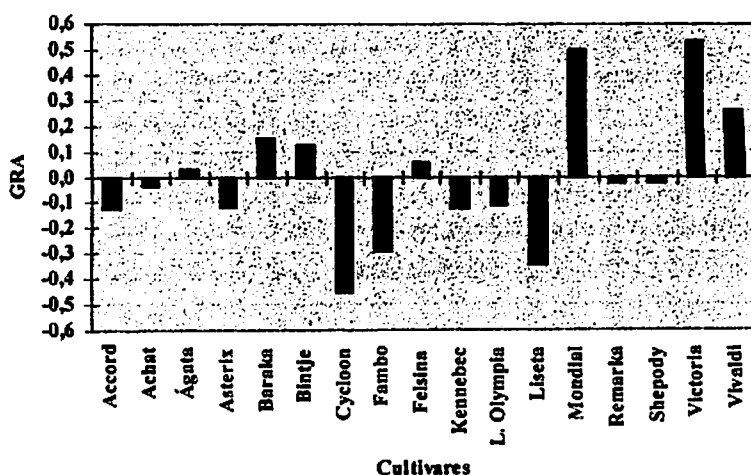


Figura 3. Estimativa da capacidade geral de reação (GRA) para 17 cultivares de batata, inoculadas com quatro isolados de PVY. UFLA, Lavras-MG, 2003.

Vale ressaltar que a inoculação aqui efetuada foi a mecânica, com a diluição de tecidos infectados/solução extratora de 1:10 (p/v), o que significa uma alta pressão de inóculo. Mello & Santos (1999), utilizando o modelo de dialelo parcial, verificaram que este foi eficiente para estimar a GRA de um genótipo submetido a situações limitantes, indicando potencial de resistência horizontal (RH). Em condições de baixa severidade da doença, o GRA da hospedeira tenderá a ser mais negativo, resultando, portanto, uma maior RH. É interessante o fato da cultivar Vivaldi ter apresentado baixa RH nas condições do experimento, pois esta tem sido cada vez mais plantada no Brasil.

Os dados obtidos da estimativa da GAA (tabela 4) mostraram diferentes níveis de agressividade entre os isolados de PVY, sendo os isolados YO-07 e YN-Mg1, em ordem decrescente, os mais agressivos, e os isolados YNBr2 e YOATL-Mg os que apresentaram os potenciais de patogenicidade mais baixos. Curiosamente o isolado YNBr2, obtido através de sucessivas inulações mecânicas em *Physalis*, não apresentou altas taxas, como observado pelo seu antecessor o YNBr (Moraes et al., 1999).

Tabela 4. Estimativa da capacidade geral de agressividade (GAA) para quatro isolados de PVY inoculados individualmente em 17 cultivares de batata. UFLA, Lavras-MG, 2003.

ISOLADO	EFEITO
1 - Y <sup>N</sup> Br2Mg	-.119085
2 - Y <sup>N</sup> -Mg1	.019462
3 - Y <sup>O</sup> ATLMg	-.048256
4 - Y <sup>O</sup> -O7Mg	.147879

Valores positivos = isolados mais agresivos. Negativos = menos agresivo

Os valores da SIA mostraram que as cultivares apresentaram diferentes quanto a resistência vertical (RV) e os isolados diferentes níveis de virulência (Figura 4). A cultivar Achat, apesar da suscetibilidade verificada para os isolados YNBr2-Mg e YO-07Mg, apresentou os maiores índices de RV para YNMg1 e YOATLMg, uma vez que valores negativos de SIA são diretamente proporcionais a RV (Mello & Santos, 1999). Estudos anteriores já haviam observada alta suscetibilidade dessa cultivar a esses mesmos isolados (Moraes et al., 1999). As cultivares Victoria e Felsina apresentaram também extremos de resistência vertical e virulência, dependendo do isolado. O interessante é que as cultivares Cycloon e Liseta, com alta RH, apresentaram padrões aparentemente semelhantes.

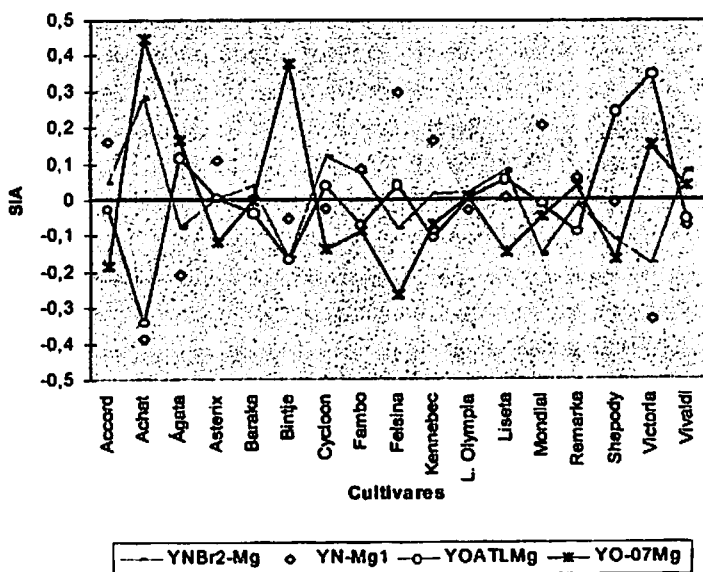


Figura 4. Capacidade de Interação Específica (SIA) de 17 cultivares de batata inoculadas individualmente com quatro isolados de PVY. Teste realizado aos 35 DPI. UFLA, Lavras-MG, 2003.

O isolado YO-07Mg que apresentou os dois maiores valores de SIA positivos, na sua interação com as cultivares Achat e Bintje respectivamente, foi também o que apresentou a maioria dos valores de SIA negativos, para as demais cultivares de batata. Inversamente, o YNMg1, foi o isolado que, apesar de apresentar os dois menores potenciais de virulência, mostrou o maior número de valores positivos na sua interação com as demais cultivares.

#### **5.4 Avaliação dos tubérculos progênes**

Não foi verificada a presença de anéis necróticos em nenhum dos tubérculos após seis meses de armazenamento em câmara fria ( $\cong 10^{\circ}\text{C}$ ), sugerindo que, provavelmente, entre os isolados necróticos não existia o NTN. Le Romancer & Nedellec (1997), estudando os sintomas induzidos pelo isolado PVY<sup>NTN</sup>-LB em 33 cultivares de batata, observaram que três fatores influenciaram no nível de reação de necrose dos tubérculos. O primeiro foi o genótipo da planta, para o qual os autores observaram uma grande diferença varietal; o segundo foi o genótipo do vírus, para o qual foi verificada uma variação de virulência entre os isolados estudados; o terceiro fator, as condições do ambiente, foi demonstrado pelas diferentes taxas de necrose dos tubérculos obtidos sob condições de temperatura limitantes durante os períodos de estoque. Apesar de algumas cultivares responderem com necrose quando inoculadas com os diferentes isolados de PVY, todas permitiram a translocação dos vírus para os seus tubérculos.

Os resultados aqui obtidos, considerando a interação entre os quatro diferentes isolados de PVY inoculados, nas 19 cultivares de batata, forneceram informações importantes sobre o comportamento dessas, que podem ser aproveitadas por técnicos dos programas de melhoramento genético em batata. Por outro lado, permitem também avaliar a agressividade/virulência dos diferentes isolados de PVY que ocorrem no Brasil.

## 6 CONCLUSÕES

1. Houve grande diversidade nas propriedades sorológicas e nos sintomas induzidos pelos isolados necróticos, sendo esses divididos em três grupos (I, II e III).

2. Entre os isolados comuns apenas o YO-07 induziu sintomas ligeiramente diferentes dos causados pelos demais.

3. As plantas de *Physalis floridana* e de *Nicotiana rustica* demonstraram potencial como indicadoras na discriminação de isolados necróticos de PVY, pois reagiram com sintomas específicos para os diferentes grupos.

4. Os isolados YNBr-Mg, YNBr2-Mg, YN404Sp e YN45-5 (grupo I) que causaram necrose das nervuras em plantas de fumo, não reagiram e/ou apresentaram uma reação extremamente fraca aos anticorpos monoclonais da Agdia (26000 e 26001).

5. Houve variabilidade nas resistências horizontal e vertical das 17 cultivares de batata, pela análise de dialelos parciais, sendo que as cultivares Clycloon, Liseta e Fambo foram as que apresentaram maior resistência horizontal e as cultivares Achat, Bintje, Felsina e Victoria, as que apresentaram maior resistência vertical, para alguns isolados.

6. Houve diversidade na virulência e agressividade dos quatro isolados de PVY testados, quando esses foram submetidos à análise de dialelos parciais.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BECZNER, L. et al. Studies on the etiology of tuber necrotic ringspot disease in potato. **Potato Research**, Wageningen, v.27, p. 339-352, 1984. ?

BLANCO-URGOITI, B. et al. Potato virus Y group C isolates are a homogeneous pathotype but two different genetic strains. **Journal of General Virology**, Great Britain, v.79, pt.8, p.2037-2042, Aug. 1998.

BOONHAM, N.; BARKER, I. Strain specific recombinant antibodies to potato virus Y potyvirus. **Journal of Virological Methods**, v.74, n.2, p.193-199, Oct. 1998.

CEROVSKÁ, N. Production of monoclonal antibodies to potato virus YNTN strain and their use for strain differentiation. **Plant Pathology**, Oxford, v.47, n.4, p.505-509, 1998. B:5

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

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

CLARK, M.F.; ADAMS, A.N. Characteristics of the microplate method of Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for detection of Plant Viruses. **Journal of General Virology**, Great Britain, v.34, p.475-483, 1977.

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

CRUZ, C.D. **Programa GENES**: Aplicativo computacional em genética e estatística. Viçosa: UFV, 1997. 442p.

DE AQUINO, L.; DALMAY, T.; BURGAYÁN, J. Host range and sequence analysis of isolate of Potato Virus Y inducing veinal necrosis in pepper. **Plant Disease**, St. Paul, v.79, n.10, p.1046-1050, Oct. 1995. B:1h



ordinary strain and necrotic strain. **Annals of the Phytopathological Society of Japan**, v.57, p.615-622, Dec. 1991.

OHSHIMA, K. et al. Production and characteristics of strain common antibodies against a synthetic polypeptide corresponding to the C-terminal region of potato virus Y coat protein. **Journal of Virological Methods**, v.40, n.3, p.265-273, 1992.

OUNOUNA, H. et al. Production of monoclonal antibodies against synthetic peptides of the N-terminal region of *Potato virus Y* coat protein and their use in PVY strain differentiation. **Plant Pathology, Oxford**, v.51, n.4, p.487-494, Aug. 2002. B. b

REVERS, F. et al. Frequent occurrence of recombinant potyvirus isolates. **Journal of General Virology, Great Britain**, v.77, pt.8, p.1953-65, Aug. 1996.

ROSE, D.G.; MCCARRA, S.; MITCHELL, D.H. Diagnosis of potato virus Y<sup>N</sup>: a comparison between polyclonal and monoclonal antibodies and a biological assay. **Plant Pathology, Oxford**, v.36, n.1, p.95-99, Mar. 1987. B. b

SANTOS, M.M.F.B.; ANDRIGUETO, J.R.; CAMARGO, C.P. **Descrição de cultivares de batata**. Brasília: Ministério da Agricultura. Secretaria Nacional de Produção Agropecuária. Coordenadoria de Sementes e Mudanças, 1986. 40p.

SANZ, A. et al. Preparation of additional monoclonal antibodies for detection and discrimination of potato virus Y isolates infecting potato. **Potato Research, Wageningen**, v.33, n.3, p.365-375, 1990.

SINGH, R.P. et al. Selection of a monoclonal antibody to detect PVY<sup>N</sup> and its use in ELISA and DIBA assays. **Canadian Journal of Plant Pathology, Guelph**, v.15, n.4, p.293-300, 1993.

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

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

TRUTA, A.A.C. D.S. **Identidade e propriedades de isolados de potyvirus provenientes de *Capsicum***. 2002. 72p. Tese (Doutorado em Fitopatologia)-Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

INOUE-NAGATA, A.K. et al. Analysis of the nucleotide sequence of the coat protein and 3'-untranslated region of two Brazilian *Potato virus Y* isolates. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.26, n.1, p.45-52, mar. 2001.

JONES, R.A.C. Strain group specific and virus specific hypersensitive reactions to infection with potyviruses in potato cultivars. **Annals of Applied Biology**, Great Britain, v.117, n.1, p.93-106, 1990.

LE ROMANCER, M.; KERLAN, C.; NEDELLEC, M. Biological characterisation of various geographical isolates of potato virus Y inducing superficial necrosis on potato tubers. **Plant Pathology**, Oxford, v.43, n.1, p.138-144, 1994. DK 3

LE ROMANCER, M.; NEDELLEC, M. Effect of plant genotype, virus isolate and temperature on the expression of the potato tuber necrotic ringspot disease (PTNRD). **Plant Pathology**, Oxford, v.46, n.1, p.104-11, 1997. B. 14

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

McDONALD, J.G. et al. Coat protein and 5' nontranslated region of a variant of potato virus Y. **Canadian Journal of Plant Pathology**, Guelph, v.19, n.2, p.138-144, 1997.

MELO, L.C.; SANTOS, J.B. Identification of resistant genotypes considering polygenic systems in host interaction. **Genetics and Molecular Biology**, v.22, n.4, p.601-608, 1999.

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

MOURY, B. et al. Evidence for diversifying selection in Potato virus Y and in the coat protein of other potyviruses. **Journal of General Virology**, Great Britain, v.83, n.10, p.2563-2573, 2002.

NIVAA **Catalogo Olandese delle varietà di patate**. Holanda: 2000, 256p.

OHSHIMA, K. et al. Comparison of biological properties, serological characteristics and amino acid sequences of coat protein between potato virus Y

ordinary strain and necrotic strain. *Annals of the Phytopathological Society of Japan*, v.57, p.615-622, Dec. 1991.

OHSHIMA, K. et al. Production and characteristics of strain common antibodies against a synthetic polypeptide corresponding to the C-terminal region of potato virus Y coat protein. *Journal of Virological Methods*, v.40, n.3, p.265-273, 1992.

OUNOUNA, H. et al. Production of monoclonal antibodies against synthetic peptides of the N-terminal region of *Potato virus Y* coat protein and their use in PVY strain differentiation. *Plant Pathology*, Oxford, v.51, n.4, p.487-494, Aug. 2002. (B.6)

REVERS, F. et al. Frequent occurrence of recombinant potyvirus isolates. *Journal of General Virology*, Great Britain, v.77, pt.8, p.1953-65, Aug. 1996.

ROSE, D.G.; MCCARRA, S.; MITCHELL, D.H. Diagnosis of potato virus Y<sup>N</sup>: a comparison between polyclonal and monoclonal antibodies and a biological assay. *Plant Pathology*, Oxford, v.36, n.1, p.95-99, Mar. 1987. (B.6)

SANTOS, M.M.F.B.; ANDRIGUETO, J.R.; CAMARGO, C.P. *Descrição de cultivares de batata*. Brasília: Ministério da Agricultura. Secretaria Nacional de Produção Agropecuária. Coordenadoria de Sementes e Mudas, 1986. 40p.

SANZ, A. et al. Preparation of additional monoclonal antibodies for detection and discrimination of potato virus Y isolates infecting potato. *Potato Research*, Wageningen, v.33, n.3, p.365-375, 1990.

SINGH, R.P. et al. Selection of a monoclonal antibody to detect PVY<sup>N</sup> and its use in ELISA and DIBA assays. *Canadian Journal of Plant Pathology*, Guelph, v.15, n.4, p.293-300, 1993.

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

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

TRUTA, A.A.C. D.S. *Identidade e propriedades de isolados de potyvirus provenientes de Capsicum*. 2002. 72p. Tese (Doutorado em Fitopatologia)-Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

## CAPÍTULO 3

**Estudo molecular nas regiões: 5'NTR, N-terminal P1, últimos 23aa. da C-terminal NIb, e N-terminal CP entre oito isolados do *Potato Virus Y* (PVY).**

## 1 RESUMO

MORAES, Flávio Henrique Reis. Estudo molecular nas regiões: 5'NTR, N-terminal P1, últimos 23aa. da C-terminal Nib, e N-terminal CP entre oito isolados de PVY. In: \_\_\_\_\_. **Caracterização de isolados do vírus Y ("Potato Virus Y" - PVY) provenientes de batata no Brasil.** 2003. p.65-114. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.<sup>1</sup>

Oito isolados de PVY, quatro necróticos e quatro comuns, tiveram as regiões genômicas seqüenciadas: a 5'NTR, a N-terminal da P1, 23aa. últimos da C-terminal Nib e N-terminal da proteína do capsídeo (CP). Essas seqüências foram comparadas entre si e com as de outros isolados já publicados. Nas regiões 5'NTR e P1, os oito isolados foram divididos em dois grupos, sendo o primeiro com o YN-21Sp, YN404Sp, YNBr-Mg e YO-07Mg, e o segundo com YO-28Sp, YO229Sp, YOATLMg e YN-UFLA. Na região 5'NTR a maior identidade observada (100%) foi entre os isolados YNBr-Mg e YO-07-Mg, e a menor (60%) entre o YN-UFLA e YNBr-Mg, YN404-Sp e o YO-07Mg e entre esses três últimos e o YOATL-Mg. Na região N-terminal da P1, a menor identidade (66%) ocorreu entre o YN-21Sp e o YO-28Sp e a maior (98%) entre o YNBr-Mg e YO-07Mg e entre YO229Sp e o YOATLMg. Comparadas com as de outros isolados, as seqüências dessas regiões originaram árvores filogenéticas semelhantes, divididas em três grupos, sendo que os YN-21Sp, YNBr-Mg, YN404-Sp e YO-07Mg ficaram no grupo I, juntos com isolados típicos PVY<sup>NNTN</sup> e o recombinante yN242-Fr, enquanto que os demais, incluindo o YN-UFLA se reuniram no II, com os isolados típicos PVY<sup>O</sup> e os recombinantes padrão Wilga (ynWi-P e pvynWi) e pvyn-Fr. O fato do isolado YO-07Mg ter sido agrupado com os isolados necróticos e o YN-UFLA com os comuns, sugere possibilidade de recombinação. Nas regiões C-terminal da NIB e N-terminal da CP, as identidades entre os oito isolados, variaram de 93 a 98%. No alinhamento da região N-terminal da CP, esses se dividiram em quatro subgrupos. Quando foram comparados com os outros isolados do banco de genes, o YO299 foi o que mais se distanciou, tendo sido agrupado com isolados provenientes dos Estados Unidos, Canadá e Argentina. A maior variabilidade na região N-terminal da CP, dos isolados estudados, ocorreu entre os necróticos, pois estes foram agrupados juntamente com os isolados pertencentes aos grupos Y<sup>O/C</sup>, os recombinantes Y<sup>N:O</sup> (sorogrupo O,C), e um isolado de pimentão, sugerindo também a possibilidade desses serem recombinantes.

---

<sup>1</sup> Comitê de orientação: Antonia dos Reis Figueira (orientadora) e Alessandra de Jesus Boari (co-orientadora).

## 2 ABSTRACT

MORAES, Flávio Henrique Reis. Study molecular of the regions: 5'NTR, N-terminal P1, the last 23aa. C-terminal Nib and N-terminal CP protein of eight PVY isolates. In: \_\_\_\_\_. **Characterization of isolates of the *Potato virus Y* (PVY) from potato in Brazil.** 2003. p.65-114. Thesis (Master program in Phytopathology) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.<sup>1</sup>

The 5'NTR region of P1 protein, the N-terminal region of P1 and capsid proteins and the C-terminal protein Nib from four PVY<sup>N</sup> isolates plus four PVY<sup>O</sup> isolates, were cloned and sequenced. The sequences of nucleotides and amino acids from those eight PVY isolates were compared among themselves and also with other isolates from GenBank and/or published elsewhere. Based on the 5'NTR and N-terminal regions of P1 protein, the eight isolates were divided in two subgroups: group 1 with YN-21Sp, YN404Sp, YNBr-Mg and YO-07Mg and group 2 with YOATLMg, YO229Sp, YO-28Sp and UN-UFLA. The grouping of YO-07Mg together with necrotic isolates as well the grouping of YN-UFLA together with common isolates could be related to the genomic recombination events. The highest identity (100%) in the alignment of 5'NTR of P1 region was between YNBr-Mg and YO-07Mg and the smallest (60%) was seen when YN-UFLA and/or YOAtMg were compared to YNBr-Mg, YN404Sp and YO-07-Mg. In the alignment of N-terminal region of P1, the smallest identity (66%) was between YN-21Sp and YO-28Sp, and the highest (98%) was between YNBr-Mg and YO-07Mg and also between YO299Sp and YOAtMg. The comparison of both 5'NTR and N-terminal regions from the eight isolates with the others PVY from different origins generate similar filogenetic trees, divided in three groups: group I (typical PVY<sup>NNTN</sup> isolates) with YN-21Sp, YNBr-Mg, YN404-Sp, YO-07Mg and yN242-Fr recombinant; group II (typical PVY<sup>O</sup> isolates) with YOATLMg, YO229Sp and YO-28Sp, YN-UFLA and Wilga (ynWi-P and pvynWi) and pvyn-Fr recombinants. The identities of the N-terminal region of Cp and C-terminal of Nib, among the eight isolates, ranged from 93 to 98%. In the alignment of N-terminal region of Cp the eight isolates were divided in four subgroups. When compared to the other isolates from GenBank the YO229Sp was grouped separately together with isolates from United States, Canada and Argentina. The highest variability of N-terminal region of Cp was observed in the necrotic isolates, which were located into the group of isolates belonging to Y<sup>OC</sup> groups, Y<sup>N:O</sup> recombinants and one pepper isolate, suggesting they could possibly be recombinants.

---

<sup>1</sup> Guidance Committee: Antonia dos Reis Figueira (Adviser); Alessandra de Jesus Boari (co-adviser).

### 3 INTRODUÇÃO

O vírus Y (*Potato virus Y* - PVY), membro típico do gênero *Potyvirus*, com alta variabilidade e amplo grupo de hospedeiras, apresenta expressiva importância econômica nas culturas de pimentão, batata, fumo e tomate, em todo o mundo (Shukla et al., 1994). O PVY possui genoma monopartido e ssRNA<sup>+</sup> com duas regiões distais não traduzíveis (5'NTR e 3'NTR), e uma única ORF que é traduzida na forma de uma poliproteína, posteriormente procesada por três proteases, dando origem de oito a dez produtos virais (P1, HC-PRO, P3, 6K1, CI, 6K2, NIa-VPg/Pro, Nib e CP) (Carrington et al., 1990; Riechmann et al., 1992). Desses, a proteína capsial (CP) é o produto gênico mais seqüenciado e estudado entre os *Potyvirus*, principalmente para PVY (Shukla & Ward, 1989a; b). Entretanto, regiões como 5'NTR, P1 e P3, entre outras, são ainda pouco conhecidas, tendo as suas funções ainda não bem definidas (Tordo et al., 1995).

A análise das seqüências de nucleotídeos dos isolados de PVY<sup>N-Fr</sup> (Robaglia et al., 1989) e PVY<sup>NTN-H</sup> (Thole et al., 1993), que possuem seqüências completas, demonstra que o grau de identidade difere dentre seus genomas. A identidade dos nucleotídeos totais entre estes dois isolados é de 88,5%, enquanto a região não traduzível 5'NTR e a região codificante, adjacente, P1, possuem somente 70,3% e 72,6% de similaridade, respectivamente, sendo então consideradas as regiões de maior variabilidade no genoma dos PVY, quando comparado com os 90,6% de identidade dos nucleotídeos, dos genes do capsídeo, e com os 80,6% a 90,3% de identidade para as proteínas não-estruturais, dominantes (Tordo et al., 1995). A região 5'NTR possui seqüências responsáveis pela tradução do genoma viral, possivelmente envolvidas na síntese de fitas positivas de RNA a partir da fita negativa (Carrington & Freed, 1990),

enquanto a proteína P1 é a primeira proteinase (Shukla et al., 1994) e atua também como fator auxiliar na replicação (Verchot & Carrington, 1995).

A proteína da capa possui diversas funções, como encapsidação do RNA, transmissão por afídeos (Atreya et al., 1990; 1995), movimento célula à célula (Rojas et al., 1997), movimento à longa distância (López-Moya & Pirone, 1998) e indução de sintomas (Naderi & Berger, 1997), podendo ser responsável pela indução de anéis necróticos nos tubérculos (Glais et al., 2002). Comparação de seqüências de aminoácidos e análise de montagem de partículas virais indicaram a presença de três regiões distintas na CP, sendo uma região amino-terminal, variável em tamanho e seqüência, uma região central, altamente conservada, com 215 a 227 aminoácidos e uma região carboxi-terminal, com 18 a 20 aminoácidos. As regiões amino e carboxi-terminais, voltadas para o exterior da molécula, são responsáveis pelas propriedades antigênicas da partícula viral (Shukla & Ward, 1989), sendo que na primeira encontra-se o maior número de domínios responsáveis pelo reconhecimento e ligação com outras partículas.

Os isolados de PVY classicamente são classificados em três grupos de estirpes, com base nas propriedades sorológicas e nos sintomas induzidos em plantas de batata, fumo e *Physalis*: comum ou PVY<sup>O</sup>, necrótica ou PVY<sup>N</sup> e PVY<sup>C</sup> (De Bokx & Hutinga, 1981). Por apresentar alta capacidade de diversificação genômica, nas últimas décadas muitos variantes de PVY têm sido descritos, incluindo recombinantes entre as estirpes PVY<sup>O,C</sup> e PVY<sup>N</sup> (Revers et al., 1996; Glais et al., 2002). Dois variantes relacionados com PVY<sup>N</sup> têm surgido: o PVY<sup>NTN</sup>, foi inicialmente detectado na Hungria (Beczner et al., 1984), associado a sintoma de anéis necróticos nos tubérculos e capacidade de infectar pimentão (Le Romancer et al. 1994); o segundo, o PVY<sup>N</sup>-Wi, detectado na Polônia em 1984 (Chzanowska, 1991), mais virulento e agressivo em cultivares de batata, sendo mais tarde constatada a sua reação sorológica com isolados PVY<sup>O</sup> (Glais et al., 1998). Isolados que induzem sintomas e reações sorológicas,



não característicos ao padrão, têm sido relatados em vários países: PVY<sup>Z</sup> (Jones, 1990), Y<sup>N</sup>-Wi na Polônia (Chzanowska, 1991; 1994), P21 da Tunísia (Fakhfakh et al., 1995), YN-Br no Brasil (Figueira & Pinto, 1995; Moraes et al., 1999); I-136 e L-56 no Canadá (McDonal et al., 1997), Y-17 na Espanha (Blanco-Urgoiti et al., 1998b) e na França (Kerlan et al., 1999).

A detecção desses variantes é importante para o controle em campo, entretanto, muitos possuem alto relacionamento bio-sorológico e molecular, dificultando a utilização de análises rotineiras. As técnicas de Biologia Molecular, por exemplo o sequenciamento, impulsionaram os estudos de caracterização e organização do genoma dos fitovírus, permitindo inclusive a verificação de recombinações gênicas entre isolados de PVY (Revers et al., 1996; Boonham et al., 2002b; Glais et al, 2002; Moury et al. 2002). Pesquisadores de vários países produtores de batata, têm trabalhado na identificação de seqüências específicas de variantes genéticos de PVY, como as regiões 5'NTR, P1 e CP, com a finalidade de desenhar primers e sondas para possibilitar uma maior precisão na diagnose (Cerovská et al., 2001; Booham et al., 2002a; Nie & Singh, 2002a; 2002b; Moravec et al., 2003).

No Brasil, apesar da existência de uma grande quantidade de isolados de PVY, com características fenotípicas diferentes, poucas são as pesquisas realizadas envolvendo a sua caracterização molecular. Nesse trabalho, oito isolados de PVY, sendo quatro pertencentes à estirpe necrótica e quatro à estirpe comum, tiveram as regiões 5'NTR, N-terminal da proteína P1, 23aa. últimos da C-terminal Nib e N-terminal da capa proteica (CP), amplificadas, clonadas e sequenciadas para a caracterização de sua variabilidade genética e identidade com outros isolados disponíveis no banco de genes. Este é o primeiro trabalho que através da comparação dos traços moleculares demonstra a possibilidade de ocorrência de isolados recombinantes entre as estirpes de PVY, no Brasil.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram efetuados nos Laboratório de Biologia Molecular do Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Lavras (DFP/UFLA).

### 4.1 Obtenção e manutenção dos isolados de PVY

Os isolados obtidos da coleção de vírus do Centro de Indexação (Tabela 1) foram caracterizados e purificados biologicamente, de acordo com a metodologia citada no Capítulo 02.

TABELA 1. Origem e características biológicas dos isolados de PVY, seqüenciados.UFLA, Lavras-MG, 2003.

Isolado	Origem e hospedeira	Necrose Fumo 'TNN'	Mosaico <i>N. rustica</i>	Desfolha <i>Physalis</i>	Elisa PVY <sup>N</sup> (26000)	Classe Biológica
YN-UFLA	Sul de Minas Gerais -Brasil, Batata. (1987)	+++	++	-	++	PVY <sup>N*</sup>
YNBr-Mg	Itajubá-MG, Brasil, Batata cv. Achat (1996)	++	-	++	-	PVY <sup>N*</sup>
YNBr2-Mg <sup>1</sup>	Mecanicamente oriundo do YNBr-Mg, estabelecido em <i>P. floridana</i> (2000)	++	-	++	-	PVY <sup>N</sup>
YN-21Sp <sup>2</sup>	São Paulo, Brasil, cv. Monalisa (1999)	+++	+++	-	+++	PVY <sup>N</sup>
YN404Sp	Capão Bonito-SP, Brasil, cv. Mondial. Cultura de tecidos (1999)	+	-	++	±	PVY <sup>N</sup>
YO-07Mg	Itajubá-MG, Brasil, Batata cv. Achat (1996)	-	++	+++	-	PVY <sup>0*</sup>
YO229Sp	São Paulo - Brasil, cv. Atlantic, Canadá Básica (1999)	-	+	+++	-	PVY <sup>0</sup>
YOATLMg	Paraguaçu-MG, Brasil, Batata cv. Atlantic (1999)	-	+	+++	-	PVY <sup>0</sup>
YO-28Sp	São Paulo - Brasil, Batata cv. Monalisa (1999)	-	+	+++	-	PVY <sup>0</sup>

1- seqüenciado somente na região N-terminal da CP e 2- somente na 5'NTR + N-terminal P1; os demais foram estudados em ambas regiões.

\*Referência: Moraes et al. (1999)

Salienta-se que o YNBr2-Mg é um variante do YNBr-Mg original, pois foi recuperado de plantas de *P. floridana*, inoculadas com esse vírus, apresentando sintomas mais severos em relação às demais. No grupo de plantas inoculadas, parte delas respondeu com sintomas severos e parte com sintomas mais brandos. Como essas características se mantiveram nas inoculações seguintes, optou-se por considerar um novo isolado.

#### 4.2 Purificação parcial do PVY e extração do RNA

Folhas de fumo cv. TNN infectadas com os isolados de PVY foram utilizadas para a purificação parcial das partículas de vírus, de acordo com Lane (1992). Para a extração do RNA viral, utilizaram-se 200µl do minipurificado em um tubo Eppendorf, juntamente com 50µl do tampão de extração (0,2M glicina, 0,2M NaCl, 20mM EDTA, pH 9,5), 20µl de SDS a 20% e 2,7µl de proteinase K (20mg/ml), incubando-se por 30min a 37°C. Ao término, realizou-se um vortex e centrifugou-se o material por 15min a 14.000 rpm. Posteriormente, transferiu-se a fase aquosa para um novo tubo, ao qual se acrescentou o mesmo volume de fenol/clorofórmio, retornando-se ao passo anterior de centrifugação. Após a repetição da fase fenol/clorofórmio, transferiu-se a fase aquosa para um novo tubo, adicionou-se 1/20vol. de 3M NaOAc pH 5,5 e 2,5vol. etanol (-20°C) e incubou-se por 1 hora a -20°C. Após uma centrifugação de 30min. a 10.000 rpm, descartou-se o sobrenadante e então lavou-se o pellet com 1ml de etanol 70%, seguido de um spin de 1min e novo descarte do sobrenadante. Posteriormente à secagem, o pellet foi resuspendido em 20µl de água esterilizada, sendo então armazenado a -80°C. A quantidade e a qualidade do RNA viral foram analisadas por meio de eletroforese em gel de agarose (0,9%).

### 4.3 Transcrição reversa e PCR

Na RT-PCR, “primers” específicos para PVY foram obtidos segundo Tordo et al. (1995) e Brioso et al. (1996), permitindo a amplificação nucleotídica das regiões 5’NTR + N’terminal P1 e os últimos 23aa da C-terminal N1b + N-terminal da proteína capsidial, referentes a 478pb e 544pb, respectivamente (Figura 1). Para a síntese da primeira fita de cDNA (RT), utilizou-se o kit “Superscript™ Preamplification System” (GibcoBRL – Cat. No. 18089-011), conforme instruções do fabricante. Cinco por cento (5%) do volume da reação de RT foram amplificados em um total de 50µl contendo: 1,5mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2mM de cada dNTPs, 5pM de cada primer e 2,5 unidades da Taq DNA polimerase (GibcoBRL) no tampão 10xPCR, recomendado pelo fabricante. Na amplificação, utilizaram-se 31 ciclos no termociclador PCT-100 (MJ Research, Inc. USA), com o programa 1 min a 94°C, 1 min a 50°C e 2 min a 72°C, seguido de um ciclo final de 10 min a 72°C. Os produtos da PCR, após eletroforese em agarose 0,9% e coloração em brometo de etídio (0.15mg/ml), foram visualizados e fotografados no Image Master (Pharmacia).

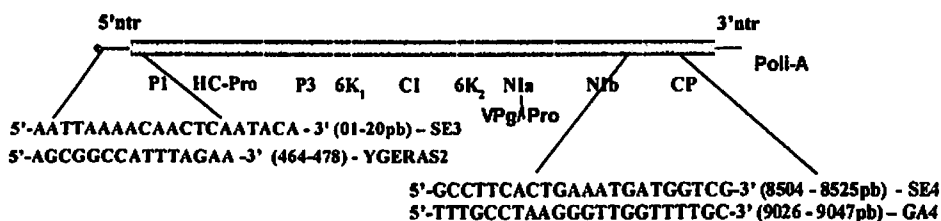


FIGURA 1. Seqüência genômica do PVY (*Potyviriidae*) e localização dos pares de primers em pb: SE3(sense)+YGERAS2(antisense), segundo Tordo et al. (1995); SE4(sense)+GA4(antisense), Brioso et al. (1996). Respectivamente numerados de acordo com o PVY<sup>NTN</sup>-H (Thole et al., 1993) e PVY<sup>N</sup>-Fr (Robaglia et al. 1989).UFLA, Lavras-MG, 2003.

#### 4.4 Clonagem e sequenciamento

Os fragmentos de DNA amplificados pela PCR (Figura 1) foram clonados no plasmídeo vetor pCR 2.1 do kit “TOPO TA Cloning System” (Invitrogen, San Diego, EUA, Cat. No. K4500-01). O procedimento foi efetuado de acordo com as recomendações do fabricante. Os plasmídeos foram purificados a partir de culturas de *Escherichia coli* pelo método da lise alcalina (Sambrook et al., 1989) e submetidos à clivagem com a enzima de restrição *EcoR* I para comprovar a presença do fragmento desejado. Os recombinantes foram seqüenciados pelo método de dideoxirribonucleotídeos terminadores (Sanger et al., 1977), utilizando o seqüenciador automático A.L.F (Pharmacia).

#### 4.5 Análises das seqüências

Após as correções das seqüências com o auxílio dos esferogramas, fizeram-se a montagem e a análise destas utilizando-se os programas online, Blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/blast.cgi>); Clustalw (<http://www.clustalw.genome.ad.jp>); Cap ([http://www.infobiogen.fr/services/analyseq/cgi-bin/cap\\_in.pl](http://www.infobiogen.fr/services/analyseq/cgi-bin/cap_in.pl)); Translate (<http://www2.ebi.ac.uk/translate>) e Revseq (<http://bioweb.pasteur.fr/seqanal/interfaces/revseq.html>). Com auxílio do Clustalw 2 (<http://www2.ebi.ac.uk/clustalw>), foram realizados os alinhamentos múltiplos das seqüências dos isolados de PVY com as disponíveis no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi>) e com outras não inseridas (Anexo B, tabelas 1 e 2). As árvores filogenéticas obtidas foram visualizadas com auxílio do programa TreeView (<http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/treeview>). Foram também obtidas árvores com bootstrap, considerando somente os valores superiores a 50%, de 2.000 repetições, utilizando o programa MEGA (<http://www.megasoftware.net>).

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Comparação das regiões 5'NTR e os primeiros 98aa. da N-terminal P1, entre os isolados estudados e com outros já publicados.

No alinhamento dos 294 nucleotídeos da região seqüenciada, que compreendeu toda a 5'NTR e os primeiros 98aa. da N-terminal da P1, verificou-se que os oitos isolados foram divididos em dois grupos distintos (Figura 2). Alinhados separadamente, os nucleotídeos das regiões 5'NTR e N-terminal da P1, apresentaram o mesmo padrão de agrupamento.

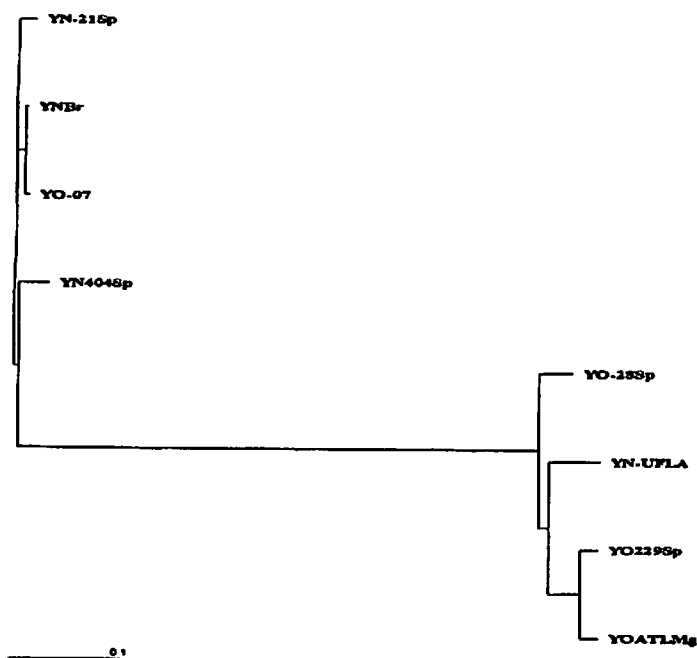


FIGURA 2. Árvore Filogenética (Sem raiz) baseada no múltiplo alinhamento de nucleotídeos da região 5'NTR e N-terminal P1, do isolados de PVY, estudados. A barra representa 0.1 substituições de nucleotídeos por sítio. UFLA, Lavras-MG, 2003.

A identidade obtida na região seqüenciada (dados não mostrados) variou de 71 a 99%, sendo a maior observada entre os isolados YNBr-Mg e YO-07 e, as menores, entre os isolados YN-UFLA e YN-21Sp, YN404Sp e YO-07, e entre esses dois últimos e o YOATLMg e YO229Sp, respectivamente. Na figura 2, observa-se que ambos os grupos reuniram isolados da estirpe necrótica com da estirpe comum sugerindo variabilidade genômica, que pode estar ligada à presença de isolados recombinantes.

### 5.1.2 Comparação da sequência de nucleotídeos da região 5'NTR.

O alinhamento múltiplo de nucleotídeos, obtido através do Clustal W, foi realizado a partir da posição 37 até o último nucleotídeo anterior ao códon de iniciação ATG, pois a maioria das seqüências publicadas, dos isolados utilizados para comparação, não discrimina os nucleotídeos iniciais (Figura 3). Entretanto, analisando-se os oitos isolados estudados, esses primeiros nucleotídeos foram conservados, exceto nas posições 27 e 33. A maior identidade observada entre os oitos isolados, nessa região, foi de 100% entre YNBr-Mg e YO-07Mg (Anexo B, tabela 3), e a menor (53%) entre YOATLMg e o YNBr-Mg, YN404Sp e YO-07. A identidade entre os outros isolados também apresentou a mesma variação.

Na figura 3 observa-se, que nas posições 51, 55, 68, 79, 83, 104, 105, 114, 115, 118, 121, 125, 129, 132, 135 a 138, 141, 150, 162, 163, 168, 176 e 186 (↓), os isolados foram inicialmente divididos em dois grupos: I (acima da linha contínua) e II (abaixo), sendo cada um dividido em dois subgrupos (linha tracejada). Entretanto, após a obtenção da árvore com bootstrap, com 2.000 repetições, observou-se divisão em três grupos (Figura 4), semelhante ao observado por Tordo et al. (1995).

	1	33	37	51	55	62
		<b>box a</b>				
		↓	↓		↓	↓
yn605-Sw	AAAUUAAAACAACUCA <u>AAUACAACAU</u> AAGAAAA	CAA	CAAAAACA	...	C...A	UUUCA
ynNt-Lb	-----ACAUAAGAAAA	CAA	CAAAAACA	...	C...A	UUUCA
ntnH-Hun	AAAUUAAAACAACUCA <u>AAUACAACAU</u> AAGAAAA	CAA	CAAAAACA	...	C...A	UUUCA
ntnTu648-Eu	-----		CAAAAACA	...	C...A	UUUCA
ntn-S148	-----		CAAAAACA	...	C...A	UUUCA
ntn-S144	-----		CAAAAACA	...	C...A	UUUCA
yn242-Fr	-AAUUAACAACUCA <u>AAUACAACAU</u> AAGAAAA	CAA	CAAAAACA	...	C...A	UUUCA
<b>YO-07Mg</b>	-AAUUAACAACUCA <u>AAUACAACAU</u> AAGAAAA	CAA	CAAAAACA	...	C...A	UUUCA
<b>YNBr-Mg</b>	-AAUUAACAACUCA <u>AAUACAACAU</u> AAGAAAA	CAA	CAAAAACA	...	C...A	UUUCA
ntn-S150	-----		CAAAAACA	...	C...A	UUUCA
I-136	-----ACAUAAGAAAA	CAA	CAAAAACA	...	C...A	UUUCA
<b>YN404Sp</b>	-AAUUAACAACUCA <u>AAUACAACAU</u> AAGAAAA	CAA	CAAAAACA	...	C...A	UUUCA
<b>YN21Sp</b>	-AAUUAACAACUCA <u>AAUACAACAU</u> AAGAAAA	CAA	CAAAAACA	...	C...A	UUUCA
ynN266-NA	-----		CAAAAACA	...	C...A	UUUCA
ynN394-NA	-----		CAAAAACA	...	C...A	UUUCA
yn27-NA	-----		CAAAAACA	...	C...A	UUUCA
ynNJg-NA	-----		CAAAAACA	...	C...A	UUUCA
ntnTu660-NA	-----		CAAAAACA	...	C...A	UUUCA
pvyn-NY	-----ACAUCGAAAA	CAA	CAAAAACA	...	C...A	UUUCA
ntnTu619-NA	-----		CAAAAACA	...	C...A	UUUCA
yn5Yt-NA	-----		CAAAAACA	...	C...A	UUUCA
<b>YN-UFLA</b>	-AAUUAACAACUCA <u>AAUACAACAU</u> CGAAAA	CAA	CAAAAACA	...	U...C	UUUCA
ynWi-P	-AAUUAACAACUCA <u>AAUACAACAU</u> AAGAAAA	CAA	CAAAAACA	...	U...C	UUUCA
<b>YO-28Sp</b>	-AAUUAACAACUCA <u>AAUACAACAU</u> AAGAAAA	CAA	CAAAAACA	...	U...C	UUUCA
pvyn-Fr	-AAUUAACAACUCA <u>AAUACAACAU</u> AAGAAAA	CAA	CAAAAACA	...	U...C	UUUCA
<b>YO229Sp</b>	-AAUUAACAACUCA <u>AAUACAACAU</u> AAGAAAA	CAA	CAAAAACA	...	U...C	UUUCA
yo139-Can	-AAUUAACAACUCA <u>AAUACAACAU</u> AAGAAAA	CAA	CAAAAACA	...	U...C	UUUCA
<b>YOATLMg</b>	-AAUUAACAACUCA <u>AAUACAACAU</u> AAGAAAA	CAA	CAAAAACA	...	U...C	UUUCA
yoTh-Ing1	-AAUUAACAACUCA <u>AAUACAACAU</u> AAGAAAA	CAA	CAAAAACA	...	GU...C	UUUCA
pvyn-Wi	-----ACAUAAGAAAA	CAA	CAAAAACA	...	U...C	UUUCA
pvyo-Lw	-----ACAUAAGAAAA	CAA	CAAAAACA	...	U...C	UUUCA
ynnNC78-NA	-----ACAUAAGAAAA	CAA	CAAAAACA	...	U...C	UUUCA
pvyo-Tu	-----ACAUAAGAAAA	CAA	CAAAAACA	...	U...C	UUUCA
pvyp21-Tu	-----ACAUAAGAAAA	CAA	CAAAAACA	...	U...C	UUUCA
pvyp2-Tu	-----ACAUAAGAAAA	CAA	CAAAAACA	...	U...C	UUUCA
yc-PVC	-----AAACAACUCA <u>AAUACAACAU</u> AAGAAAA	CAA	CAAAAACA	...	U...C	UUUCA
<b>Consenso</b>			<b>CGCAAAAACA</b>	<b>CUCA</b>	<b>AAA</b>	<b>gCUu...</b>

FIGURA 3. Alinhamento múltiplo de nucleotídeos da região 5'NTR de diferentes isolados de PVY. Os isolados estudados estão em destaque. A linha contínua limita os grupos I (acima) e II (abaixo). Linha tracejada tentativa de separar em subgrupos. Os pontos nas seqüências equivalem aos aminoácidos consenso para todos (letras maiúsculas, na última linha) e para maioria (letras minúsculas). Os traços representam nucleotídeos não determinados. Numeração de acordo com PVY-H (Thole et al., 1993). A seta ↓ indica posições que tendem a separar os grupos e a ↓ parcialmente separam. As caixas inteiras (UUUCA) e tracejadas (CA)<sub>n</sub> foram mostradas por Tordo et al. (1995). *Box a* e *b* estão em negrito marcados por um traço, segundo Turpen (1989). UFLA, Lavras-MG, 2003...(continua)...



	63	68	75	79	83	93	97	104	114	118							
		↓	<i>box-b</i>	↓	↓	↓	↓↓	↓	↓↓↓	↓↓	↓						
yn605-Sw	.C..A.U.	CAA	CAA	U..U..	JUUC	A..CG..	U.CAU	CAA	CAA	CAA	CUCUUUCA						
yntn-Lb	.C..A.U.	CAA	CAA	U..U..	JUUC	A..CG..	U.CAU	CAA	CAA	CAA	CUCUUUCA						
ntnH-Hun	.C..A.U.	CAA	CAA	U..U..	JUUC	A..CG..	U.CAU	CAA	CAA	CAA	CUCUUUCA						
ntnTu648-Eu	.C..A.U.	CAA	CAA	U..U..	JUUC	A..CG..	U.CAU	CAA	CAA	CAA	CUCUUUCA						
ntn-S148	.C..A.U.	CAA	CAA	U..U..	JUUC	A..CG..	U.CAU	CAA	CAA	CAA	CUCUUUCA						
ntn-S144	.C..A.U.	CAA	CAA	U..U..	JUUC	A..CG..	U.CAU	CAA	CAA	CAA	CUCUUUCA						
YN242-Fr	.C..A.U.	CAA	CAA	U..U..	JUUC	A..CG..	U.CAU	CAA	CAA	CAA	CUCUUUCA						
<b>YO-07Mg</b>	.C..A.U.	CAA	CAA	U..U..	JUUC	A..CG..	U.CAU	CAA	CAA	CAA	CUCUUUCA						
<b>YNBr-Mg</b>	.C..A.U.	CAA	CAA	U..U..	JUUC	A..CG..	U.CAU	CAA	CAA	CAA	CUCUUUCA						
ntn-S150	.C..A.U.	CAA	CAA	U..U..	JUUC	A..CG..	U.CAU	CAA	CAA	CAA	CUCUUUCA						
I-136	.C..A.U.	CAA	CAA	U..U..	JUUC	A..CG..	U.CAU	CAA	CAA	CAA	CUCUUUCA						
<b>YN404Sp</b>	.C..A.U.	CAA	CAA	U..U..	JUUC	A..CG..	U.CAU	CAA	CAA	CAA	CUCUUUCA						
<b>YN21Sp</b>	.C..A.U.	CAA	CAA	U..U..	JUUC	A..CG..	U.CAU	CAA	CAA	CAA	CUCUUUCA						
ynN266-NA	....A..	CAA	CAA	U..U..	JUUC	A..CG..	U.CCGU	G.A..	AC	GUUUCA							
ynN394-NA	....A..	CAA	CAA	U..U..	JUUC	A..CG..	U.CCGU	G.A..	AC	GUUUCA							
yn27-NA	....A..	CAA	CAA	U..U..	JUUC	A..CG..	U.CCGU	G.A..	AC	GUUUCA							
ynNJg-NA	....A..	CAA	CAA	U..U..	JUUC	A..CG..	U.CCGU	G.A..	AC	GUUUCA							
ntnTu660-NA	....A..	CAA	CAA	U..U..	JUUC	A..CG..	U.CGU	G.A..	AC	GUUUCA							
pvyn-NY	....A..	CAA	CAA	U..U..	JUUC	A..CG..	U.CGU	G.A..	AC	GUUUCA							
ntnTu619-NA	....A..	CAA	CAA	U..U..	JUUC	A..CG..	U.CGU	G.A..	AC	GUUUCA							
yn5Yt-NA	.C..A..	CAA	CAC	U..U..	JUUC	A..CG..	U.CGU	G.A..	AC	UUUCA							
<b>YN-UFLA</b>	....C..	CAA	CAAC	..C..	JUUC	A..AA..	A.UUC	U.G..	UU	UC..A.							
ynWi-P	....C..	CAA	CAAC	..C..	JUUC	A..AA..	A.UUC	U.G..	UU	UC..A.							
<b>YO-28Sp</b>	....C..	CAA	CAAC	..AC..	JUUC	A..AA..	A.UUC	U.G..	UU	UC..A.							
pvyn-Fr	....C..	CAA	CAAC	..C..	JUUC	A..AA..	A.UUC	U.G..	UU	UC.AG.							
<b>YO229Sp</b>	....C..	CAA	CAUC	..C..	JUUC	A..AA..	A.UUC	U.G..	UU	UC..A.							
yo139-Can	....C..	CAA	CAUC	..C..	JUUC	A..AA..	A.UUC	U.G..	UU	UC..A.							
<b>YOATLMg</b>	....C..	CAA	CAUC	..C..	JUUC	A..AA..	A.UUC	U.G..	UU	UC..A.							
yoTh-Ingl	....C..	CAA	CAAC	..C..	JUUC	A..AA..	A.UUC	U.G..	UU	UC..A.							
pvyn-Wi	....C..	CAA	CAAC	..C..	JUUC	A..AA..	A.UUC	U.G..	UU	UC..A.							
pvyo-Lw	....C..	CAA	CAAC	..C..	JUUC	A..AA..	A.UUC	U.G..	UU	UC..A.							
ynnNC78-NA	....C..	CAA	CAAC	..C..	JUUC	A..AA..	A.UUC	U.G..	UU	UC..A.							
pvyo-Tu	..U.C..	CAA	CAAC	..C..	JUUC	A..AA..	A.UUC	U.G..	UU	UC..U.							
pvyp21-Tu	..U.C..	CAA	CAAC	..C..	JUUC	A..AA..	A.UUC	U.G..	UU	UC..U.							
pvyp2-Tu	..U.C..	CAA	CAAC	..C..	JUUC	A..AA..	A.UUC	U.G..	UU	UC..U.							
yc-PVC	..U.C..	CAA	CAAC	..C..	JUUC	A..AA..	A.UUC	U.G..	UU	UC..U.							
<b>Concenso</b>	AuUcU	AcU	CAAG	CAa	UUg	UAAG	U	CA	uUU	auC	u	C	u	caa	o	Uu	A

FIGURA 3 ...(continua)...

	125	129	135	141	150	155	162	169	176	180			
	↓	↓	↓	↓--↓	↓	↓↓	↓↓	↓↓↓	↓	↓↓			
yn605-Sw	UUUCAG	.U.	GCUA	.G.....	GU	..UU	UUUCAAA	....CGU	.A	UGC	.GA.		
yntn-Lb	UUUCAG	.U.	GCUA	.G.....	GU	..UU	UUUCAAA	....CGU	.A	UGC	.GA.		
ntnH-Hun	UUUCAG	.U.	GCUA	.G.....	GU	..UU	UUUCAAA	....CGU	.A	UGC	.GA.		
ntnTu648-Eu	UUUCAG	.U.	GCUA	.G.....	GU	..UU	UUUCAAA	....CGU	.A	UGC	.GA.		
ntn-S148	UUUCAG	.U.	GCUA	.G.....	GU	..UU	UUUCAAA	....CGU	.A	UGC	.GA.		
ntn-S144	UUUCAG	.U.	GCUA	.G.....	GU	..UU	UUUCAAA	....CGU	.A	UGC	.GA.		
yN242-Fr	UUUCAG	.U.	GCUA	.G.....	GU	..UU	UUUCAAA	....CGU	.A	UGC	.GA.		
<b>YO-07Mg</b>	UUUCAG	.U.	GCUA	.G.....	GU	..UU	UUUCAAA	....CGU	.A	UGC	.GA.		
<b>YNBr-Mg</b>	UUUCAG	.U.	GCUA	.G.....	GU	..UU	UUUCAAA	....CGU	.A	UGC	.GA.		
ntn-S150	UUUCAG	.U.	GCUA	.G.....	GU	..UU	UUUCAAA	....CGU	.A	UGC	.GA.		
I-136	UUUCAG	.U.	GCUA	.G.....	GU	..UU	UUUCAAA	....CGU	.A	UGC	.GA.		
<b>YN404Sp</b>	UUUCAG	.U.	GCUA	.G.....	GU	..UU	UUUCAAA	....CGU	.A	UGC	.GA.		
<b>YN21Sp</b>	UUUCAG	.U.	GCUA	.G.....	GU	..UU	UUUCAAA	....CGU	.A	UGC	.GA.		
ynN266-NA	UUUCAG	.U.	GUUC	.G...C...	U	GUUU	UUUCAAA	....CU	..A	.GU	.AC.		
ynN394-NA	UUUCAG	.U.	GUUC	.G...C...	U	GUUU	UUUCAAA	....CU	..A	.GU	.AC.		
yn27-NA	..UUC	.G..U.	GUUC	.G...C...	U	GUUU	UUUCAAA	....CU	..A	.GU	.AC.		
ynNJg-NA	..UUC	.G..U.	GUUC	.G...C...	U	GUUU	UUUCAAA	....CU	..A	.GU	.AC.		
ntnTu660-NA	..UUC	.G..U.	GUUC	.G...C...	U	GUUU	UUUCAAA	....CU	..A	.GC	.AC.		
pvyn-NY	..UUC	.G..U.	GUUC	.G...C...	U	GUUU	UUUCAAA	....CU	..G.	.GC	.AC.		
ntnTu619-NA	..UUC	.G..U.	GUUC	.G...C...	U	GUUU	UUUCAAA	....CU	..A	.GC	.AC.		
yn5Yt-NA	..UUC	.G..U.	GUUA	.G...C...	U	UU	UUUCAGU	...-U	..A	.GU	.AC.		
<b>YN-UFLA</b>	..GAU	.U..G.	ACCAUUUCAAC	CAAC	..CA	UUUCU	-U.A.	UCCAACCAUUUUU					
ynWi-P	..GAU	.U..G.	ACCAUUUCAAC	CAAC	..UA	UUUCU	-U.A.	UCCAACCAUUUUU					
<b>YO-28Sp</b>	..AAU	.U..G.	ACCAUUUCAAC	CAAC	..CA	UUUCU	-U.A.	UCCAACCAUUUCA					
pvyn-Fr	..AAU	.U..G.	ACCAUUUCAAC	CAAC	..CA	UUUCU	-U.A.	UCCAACCAUUUCA					
<b>YO229Sp</b>	..AAU	.U..G.	ACCAUUUCAAC	CAAC	..CA	UUUCU	-U.A.	UCCAACCAUUUUU					
yo139-Can	..AAU	.U..G.	ACCAUUUCAAC	CAAC	..CA	UUUCU	-U.A.	UCCAACCAUUUUU					
<b>YOATLMg</b>	..AAU	.U..G.	ACCAUUUCAAC	CAAC	..CA	UUUCU	-U.A.	UCCAACCAUUUUU					
yoTh-Ingl	..AAU	.U..G.	ACCAUUUCAAC	CAAC	..CA	UUUCU	-U.A.	UCCAACCAUUUCA					
pvyn-Wi	..AAU	.U..G.	ACCAUUUCAAC	CAAC	..CA	UUUCU	-U.A.	UCCAACCAUUUCA					
pvyo-Lw	..AAU	.U..G.	ACCAUUUCAAC	CAAC	..CA	UUUCU	-U.A.	UCCAACCAUUUCA					
ynnNC78-NA	..AAU	.U..G.	ACCAUUUCAAC	CAAC	..CA	UUUCU	-U.A.	UCCAACCAUUUCA					
pvyo-Tu	..GAU	.U..A.	ACCG	.C..G.	CAAC	..CC	..C..-UU	..UU	..C.	CU	.GC.		
pvyp21-Tu	..GAU	.U..A.	ACCG	.C..G.	CAAC	..CC	..C..-UU	..UU	..C.	CU	.GC.		
pvyp2-Tu	..GAU	.U..A.	ACCG	.C..G.	CAAC	..UC	..C..-UU	..UU	..C.	CU	.GC.		
yc-PVC	..GAU	.U..A.	ACCG	.C..G.	G.C	..CU	..C..-CU	..AC	..C.	UU	.GC.		
<b>Concenso</b>	<b>Ac</b>	<b>A</b>	<b>uG</b>	<b>aA</b>	<b>Uc</b>	<b>uAAuUCaa</b>	<b>aag</b>	<b>AUUuCA</b>	<b>cuCU</b>	<b>cAA</b>	<b>ua</b>	<b>a</b>	<b>A</b>

FIGURA 3 ...(continua)...

	182	189
	↓	↓
yn605-Sw	G...A..CATG	
yntn-Lb	G...A..CATG	
ntnH-Hun	G...A..CATG	
ntnTu648-Eu	G...A..CATG	
ntn-S148	G...A..CATG	
ntn-S144	G...A..CATG	
yn242-Fr	G...A..CATG	
<b>YO-07Mg</b>	G...A..CATG	
<b>YNBr-Mg</b>	G...A..CATG	
ntn-S150	G.C.A..CATG	
I-136	G...A..CATG	
<b>YN4048p</b>	G...A..CATG	
<b>YN218p</b>	G...A..CATG	
ynN266-NA	T.C.AG.CATG	
ynN394-NA	T.C.AG.CATG	
yn27-NA	T.C.AG.CATG	
ynNJg-NA	T.C.AG.CATG	
ntnTu660-NA	T.C.AG.CATG	
pvyn-NY	T.C.AG.CATG	
ntnTu619-NA	T.C.AG.CATG	
yn5Yt-NA	T...AG.CATG	
<b>YNUFLA</b>	G...C..AATG	
ynWi-P	G...C..AATG	
<b>YO-288p</b>	G...C..AATG	
pvyn-Fr	G...C..AATG	
<b>YO2298p</b>	A...C..CATG	
yo139-Can	A...C..CATG	
<b>YOATLMg</b>	A...C..CATG	
yoTh-Ingl	G...C..AATG	
pvyn-Wi	G...C..AATG	
pvyo-Lw	G...C..AATG	
ynnNC78-NA	G...C..AATG	
pvyo-Tu	T...C..CATG	
pvyp21-Tu	T..TC..CATG	
pvyp2-Tu	T..TC..CATG	
yc-PVC	T..TC..CATG	
<b>Concenso</b>	<b>Atc tc ***</b>	

FIGURA 3, cont.

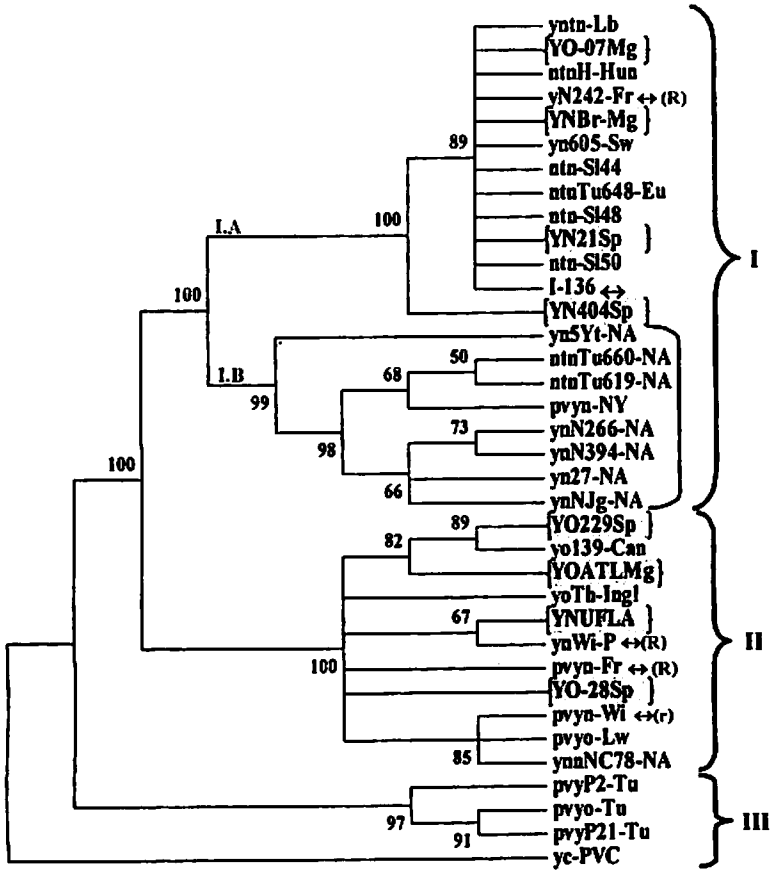


FIGURA 4. Árvore filogenética obtida com base nas seqüências de nucleotídeos da região 5'NTR de diferentes isolados de PVY. Grupos I, II e III, de acordo com Tordo et al. (1995). (R) = PVY<sup>N:O</sup>, serogrupo PVY<sup>O:C</sup>, com sítios de recombinação reconhecidos e (r) = não reconhecidos. Os valores de bootstrap foram obtidos através do programa MEGA ver 2.1, com 2.000 repetições, sendo mostrados os valores acima de 50%. UFLA, Lavras-MG, 2003.

O comprimento da região 5'NTR dos diferentes isolados de PVY demonstrou pequena variação entre os dois grupos (I e II). Todos os isolados do grupo I apresentaram duas inserções, uma de três nucleotídeos (posições 60 a 62) e a outra com um nucleotídeo (posição 162), não observadas nos isolados do grupo II (Figura 3). Também se verifica que a variação nessa região não foi uniformemente distribuída, sendo maior na segunda metade da seqüência.

Os nucleotídeos localizados na posição de 19 a 35 e 71 a 77 (figura 2) que compõem os blocos denominados por Turpen (1989) como “*box a*” (<sub>19</sub>ACAACAU<sub>25</sub>) e “*box b*” (<sub>71</sub>UCAAGCA<sub>77</sub>), mostraram-se conservados entre os oitos isolados estudados, exceto no segundo bloco, onde alguns desses isolados, por exemplo o YO-07Mg, YNBr-Mg e YN404Sp, do grupo I, não apresentaram a guanina (G) na posição 75. Foi verificada também a presença das seqüências “*motifs*” CAAn (duplicadas/triplicadas) e UUUCA/UUCCA, observadas anteriormente por Tordo et al. (1995). Em alguns casos, estas seqüências foram específicas e/ou conservadas nos grupos I e II, como por exemplo a UUUCA, encontrada nas posições 58 a 62 e 118 a 122.

Examinando a árvore filogenética obtida com base nas seqüências de nucleotídeos da região 5'NTR (Figura 4), observa-se a divisão em três grupos, como proposto por Tordo et al. (1995). O grupo I, com bootstrap de 100%, foi composto pelos isolados PVY<sup>NNTN</sup>, recombinantes yn242-Fr (Glais et al., 1998; 2002) e I-136 (McDonald & Singh, 1996; McDonald et al. 1997), isolados necróticos oriundos de países europeus, e quatro dos oito isolados estudados (YNBr-Mg, YN21Sp, YN404Sp e YO-07Mg). É atípico o fato do isolado comum YO-07Mg se agrupar com isolados necróticos, sugerindo variabilidade. Também se observa que os necróticos norte americanos formaram um subgrupo à parte (I.B, figura 4), confirmando que esta região pode ser utilizada em estudos de agrupamento geográfico, pois esses se diferenciam dos isolados da Europa, como verificado por Nie & Singh (2002a; 2002b), exceto para o isolado polonês

(pvyn-Ny). Os outros quatro isolados (YO229Sp, YOATLMg, YO-28Sp e o YN-UFLA) ficaram localizados no grupo II, juntamente com isolados da estirpe comum (PVY<sup>O</sup>) e os recombinates da França (Revers et al., 1996; Kerlan et al., 1999) e padrão Wilga: yn-Wi (Chrzanowska 1991; 1994); ynWi-P (Glais et al., 1998; 2002). Nota-se que houve a inclusão de um dos isolados necróticos estudados, o YN-UFLA, de maneira atípica no grupo II, sugerindo também variabilidade. O grupo III, foi formado por isolados oriundos da Tunísia (Fakhfakh et al., 1995) e pelo yc-PVC .

### 5.1.3 Comparação da sequência de aminoácidos da região N-terminal P1.

Assim como o observado para a região 5'NTR (Figura 2), na N-terminal da P1 os oitos isolados estudados se dividiram em dois grupos (dados não mostrados), sendo a maior identidade observada, de 98% (Anexo B, tabela 4), entre os isolados YNBr-Mg e YO-07Mg e entre o YO229Sp e YOATLMg, e a menor, de 66%, verificada entre YN-21Sp e YO-28Sp. O alinhamento múltiplo de nucleotídeos (Figura 5), obtido através do Clustal W, foi realizado entre os oitos isolados e entre esses e outros 42 isolados publicados (Anexo B, tabela 1). A identidade obtida variou de 63 a 100% (Anexo B, tabela 4), sendo a menor verificada entre os isolado yP21-Tu, com o YNBr-Mg, YN404Sp e YO-07Mg, e a maior observada entre esse último com ntnSl44. Esses dados confirmam que a proteína P1 apresenta alta variabilidade, segundo Tordo et al. (1995).

Na figura 5, observa-se que alguns aminoácidos nas posições 9, 23, 27, 28, 29, 34, 35, 36, 37, 42, 45, 52, 56, 61, 68, 84, 86 e 87 (↓) dividiram os isolados em dois grupos: I (acima da linha contínua) e II (abaixo), sendo esses ainda divididos em dois subgrupos (linha tracejada). Após a obtenção da árvore com bootstrap, observou-se a divisão em três grupos (Figura 6), semelhante à região 5'NTR, como verificado por Tordo et al. (1995).

	1	9	23	26	29	34	37	42	52	56
ntnTu648-Eu	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
ntn-Slov	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
ntn-S150	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
ntn-S164	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
yn605-Sw	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
yn-Din	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
<b>YNBr-Mg</b>	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
yn242-Fr	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
<b>YO-07Mg</b>	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
ntn-S144	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
<b>YN404Sp</b>	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
<b>YN-21Sp</b>	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
ntnH-Hun	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
ynN266-NA	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
ynN394-NA	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
ynNJg-NA	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
ynN27-NA	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
ntnTu619-NA	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
ntnTu660-NA	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
pvyn-Ny	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
yn-Ingl	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
ntn-Calif	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
yn-Russo	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
yn5yt-NA	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
<b>YN-UFLA</b>	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
ynWi-P	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
<b>YO-28Sp</b>	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
yo-Ucr	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
pvyn-Fr	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
yo803-Finl	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
ynUK-RU	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
yoViiK-Finl	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
yn-RUS	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
pvyn-Wi	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
pvyo-LW	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
ynnNC78-NA	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
yoLoi-Finl	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
yoTh-Ingl	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
<b>YO229Sp</b>	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
<b>YOat1Mg</b>	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
yo139-Can	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
yoNB-Can	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
yo-USA	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
yoBC-Can	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
pvyp2-Tu	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
pvyp21-Tu	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
pvyo-Tu	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
yc-PVC	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
yc-Esc	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
pvpy-MN	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
<b>Concenso</b>	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓

FIGURA 5. ver título na próxima página.

**FIGURA 5.** Alinhamento múltiplo de aminoácidos da região N-terminal da proteína P1 de diferentes isolados de PVY. Os isolados estudados estão em destaque. A linha contínua limita os grupos I (acima) e II (abaixo). Linha tracejada tentativa de separar subgrupos. Os pontos nas seqüências equivalem aos aminoácidos consenso para todos (letras maiúsculas, na última linha) e para maioria (letras minúsculas). Numeração de acordo com PVY-H (Thole et al., 1993). A seta ↓ indica posições que tendem a separar os grupos e a ↓ parcialmente separam. UFLA, Lavras-MG, 2003...(continua)...



	61	67	75	84	88	98
ntnTu648-Eu	↓↓	↓↓	↓	↓	↓	↓↓↓
ntn-Slov	TS...CM	....V	.A	....R	ERE	.....
ntn-S150	TS...CM	....V	.A	....R	ERE	..G
ntn-S164	TS...CM	....V	.A	....R	ERE	.....
yn605-Sw	TS...CM	....V	.A	....R	ERE	.....
yn-Din	TS...CM	....V	.A	....R	ERE	.....
<b>YNBr-Mg</b>	TS...CM	....V	.A	....R	ERE	.....
yn242-Fr	TS...CM	....V	.A	....R	ERE	.....
<b>YO-07Mg</b>	TS...CM	....V	.A	....R	ERE	.....
ntn-S144	TS...CM	....V	.A	....R	ERE	.....
<b>YN404Sp</b>	TS...CM	....A.V	.A	....R	ERE	.....
<b>YN-21Sp</b>	TS...CM	....V	.A	....R	ERE	.....
ntnH-Hun	TS...CM	....A	.A	....R	ERE	.....
ynN266-NA	TS.S	..CM	....V	.AH	....R	ERE
ynN394-NA	TS.S	..CM	....V	.AH	....R	ERE
ynN394-NA	TS.S	..CM	....V	.AH	....R	ERE
ynN27-NA	TS.S	..CM	....V	.AH	....R	ERE
ntnTu619-NA	TS.S	..CM	....V	.A	....R	ERE
ntnTu660-NA	TS.S	..CM	....V	.A	....R	ERE
pvyn-Ny	TS...CM	....V	.A	....R	ERE	..H
yn-Ingl	TS.S	..CM	....V	.A	....R	ERE
ntn-Calif	TS.S	..CM	....V	.A	....R	ERE
yn-Russo	TS...CM	....V	.A	....R	ERE	..H
yn5yt-NA	TS.S	..CM	....A	.A	....R	ERE
<b>YN-UPLA</b>	VL...LT	....A	.T	....L	RKD	...H
ynWi-P	VL...LT	....A	.T	....L	RKD	...H
<b>YO-28Sp</b>	VL...FT	....A	.M	....L	RKD	...H
yo-Ucr	VL...FT	....A	.T	....L	RKD	...H
pvyn-Fr	VL...FT	....A	.M	....L	RKD	...H
yo803-Finl	VL...LT	....A	.T	....L	RKD	..HH
ynUK-RU	VL...LT	....A	.T	....L	RKD	..HH
yoViiK-Finl	VL...LT	....A	.T	....L	RKD	...H
yn-RUS	VL..D	..LT	....A	.T	....L	RKD
pvyn-Wi	VL...LT	....A	.T	....L	RKD	.....
pvyo-LW	VL...LT	....A	.T	....L	RKD	.....
ynnNC78-NA	VL...LT	....A	.T	....L	RKD	.....
yoLoi-Finl	VL...LT	....A	.T	....L	RKD	.....
yoTh-Ingl	VL...FT	....A	.M	....L	RKD	...H
<b>YO229Sp</b>	VL...FT	....A	.K	....L	RKD	...H
<b>YOAt1Mg</b>	VL...FT	....A	.K	....L	RKD	...H
yo139-Can	VL...FT	....A	.K	....L	RKD	...H
yoNB-Can	VL...FT	....A	.K	....L	RKD	...H
yo-USA	VL...LT	....A	.T	....L	RKD	...H
yoBC-Can	VL...FT	....A	.T	....L	RKEK	...H
pvyp2-Tu	VL...RA	....A	.V.T	....L	RKE	..D
pvyp21-Tu	VL...RA	....A	.V.T	....L	RKE	..D
pvyo-Tu	VL...RA	....A	.V	....L	RKE	..D
yc-PVC	VL...CA	....A	.V	....L	RKE	..D
yc-Esc	VL...CA	....A	.V	....RL	RKE	..D
pvyp-MN	ML...YV	....T	.A	....RL	KKEK	..D
Concenso	KngT	YRYKtD	QI	riQKk	E	..:reeynFQMAA

FIGURA 5, cont.

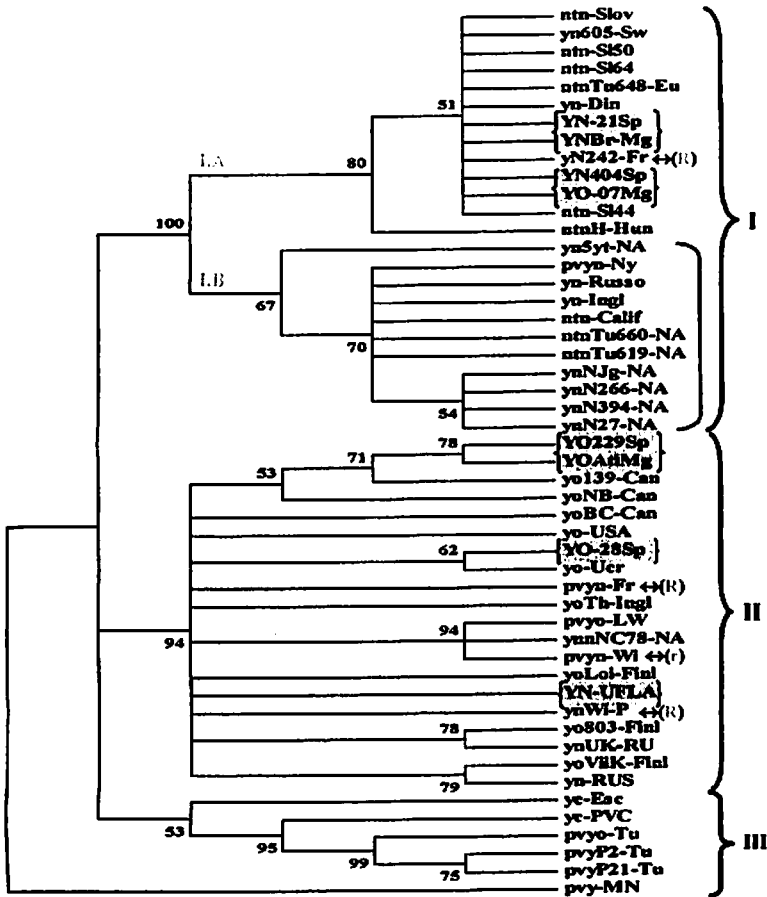


FIGURA 6. Árvore filogenética obtida com base nas seqüências de aminoácidos da região N-terminal da proteína P1 de diferentes isolados de PVY. Grupos I, II e III de acordo com Tordo et al. (1995). (R) = PVY<sup>N:O</sup>, serogrupo PVY<sup>O,C</sup>, com sítios de recombinação reconhecidos e (r) = não reconhecidos. Os valores de bootstrap foram obtidos através do programa MEGA ver 2.1, com 2.000 repetições. UFLA, Lavras-MG, 2003.

É interessante observar na figura 5, que os isolados do grupo II, e os isolados norte americanos (abaixo da linha tracejada do grupo I) com algumas exceções, e o pvyn-Ny da Polônia, apresentam, na posição cinco, o aminoácido metionina (M), que poderia representar um segundo códon de iniciação (AUG). Os outros resíduos de metionina, detectados nas posições 45 e 98, só foram observados para os isolados do grupo I, sendo ausentes nos demais.

Verifica-se também na figura 6, com exceção dos isolados pvy-Ny, yn-Russo e yn-Ingl, que dentro do grupo I os isolados norte americanos se agruparam separadamente (I.B) dos oriundos dos países Europeus (I.A), com 100% de confiabilidade, como descrito por Nie & Singh (2002a; b).

## **5.2 Comparação dos últimos 23aa. da região C-terminal N1b e 158aa. da N-terminal da capa (CP) entre os isolados estudados e com outros já publicados.**

Considerando toda a região sequenciada (544pb = últimos 69pb da região C-terminal N1b e os primeiros 475pb da região N-terminal CP), observou-se que as identidades entre os oito isolados estudados variou de 95 a 99% (dados não mostrados). Após a tradução dessa região (181aa.), a menor identidade foi de 93% (Anexo B, tabela 5 - diagonal superior), verificada entre o YN-UFLA e o YNBr2-Mg e o YO229Sp, e a maior (98%) entre os isolados YNBr-Mg e o YN404Sp, Y0-07Mg e Y0ATLMg e quando comparados esses três últimos entre si. A árvore filogenética da região N-terminal CP, não enraizada (Figura 7), bem como a obtida quando se considerou apenas os últimos 23aa da C-terminal N1b (dados não mostrados), apresentaram a mesma disposição, dividindo os isolados em quatro subgrupos, sendo dois homogêneos (somente necróticos ou comuns) e dois heterogêneos (contendo necróticos e comuns).

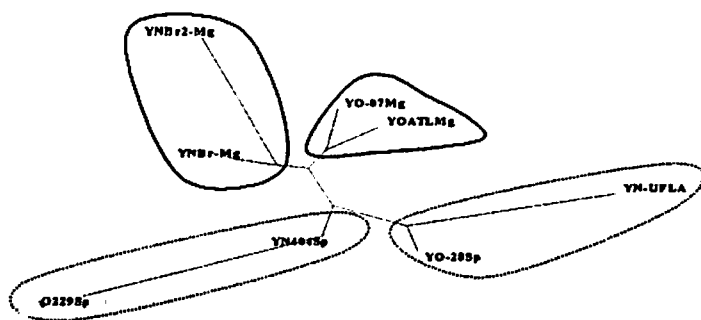


FIGURA 7. Árvore filogenética (sem raiz) baseada no múltiplo alinhamento de aminoácidos da região N-terminal CP, dos isolados de PVY estudados. A barra representa 0,01 substituições por sítio. UFLA, Lavras-MG, 2003.

### 5.2.1 Comparação dos últimos 23aa. da região C-terminal da proteína N1b.

No alinhamento dos últimos 23aa. da C-terminal N1b (Figura 8) observa-se que, com base no aminoácido da posição 17, a separação em dois grupos, aqui denominados como I e II, sendo que o grupo I apresenta treonina (T) e o II serina (S). Na posição 15, todos os isolados do grupo I apresentam cisteína (C), enquanto a maioria dos isolados do grupo II apresenta fenilalanina (F), com exceção do YN-UFLA e o recombinante pvyn-Fr (Revers et al., 1996) que possuem leucina (L). Verifica-se que a região de clivagem da N1a proteinase (VXHQ/A,G) permaneceu conservada, com exceção do resíduo X, posição 21, onde os isolados YN-UFLA e YO-28SP apresentaram a histidina (H) e os YNB-Mg, YNB2-Mg, YN-404Sp, YO-07Mg, YO299Sp e YO-ATLMg, tirosina (Y).

	1	15	17	23	
		↓	↓		
ntnv951204-N	.....	L.C.T.....	G		
ntn-Slov94	.....	L.C.T.....	G		
ntnH-Hun	.....	L.C.T.....	G		
yn-RUS	.....	I.C.T.....	G		
pvy-Nt1	.....	C.T.....	G		I
yn605-Sw	.....	C.T.....	G		
Yn27-92-Can	.....	C.T.....	G		
yn-T-Jap	.....	C.T.....	G		
ntn53-29-Din	.....	C.T.....	G		
yN-RB-RU	.....	C.T.....	G		
yn-N854	.....	C.T.....	G		
PVY-NBr	.....	C.T.....	G		
yGO16-Germ	.....	CGT.....	G		
<b>YN-UFLA</b>	.....	L.S.....	A		
pvyn-Fr	.....	L.S.....	A		
yVN-Kor	.....	A.....LES.....	A		
<b>YNBr-Mg</b>	.....	F.S.....	Y.A		
yO803-Sw	.....	G.....F.S.....	Y.A		
<b>YNBr2-Mg</b>	.....	F.S.....	Y.A		
<b>YN-404Sp</b>	.....	F.S.....	Y.A		II
<b>YO-07Mg</b>	.....	F.S.....	Y.A		
<b>YO299Sp</b>	.....	F.S.....	Y.A		
<b>YO-ATLMg</b>	.....	F.S.....	Y.A		
yo139-Can	.....	F.S.....	Y.A		
PVY-OBr	.....	F.S.....	A		
yC-CM-RU	.....	F.S.....	V		
pvy-Chin	.....	F.S.....	A		
<b>YO-28Sp</b>	.....	F.S.....	A		
yoSm-Índia	...D.....	F.S.....	A		
yo-v951204	.....	F.S.....	A		
yo-Jap	.....	F.S.....	A		
yoNN-UK-O	.....	C.S.....	A		
yoO-Tom-Port	.....	C.S.....	A		
<b>Consenso</b>		<b>AFTeMMvalDDEEE</b>	<b>d YEVhRQG/A/V</b>		

FIGURA 8. Alinhamento múltiplo dos últimos 23aa da região C-terminal da proteína Nlb, entre diferentes isolados de PVY. As setas - ↓ indicam os resíduos que separam os grupos denominados aqui de I e II. As letras maiúsculas da última linha representam os aminoácidos, consenso a todas seqüências, e as minúsculas, consenso para a maioria. O traço - | indica o fim da Nlb. A região de reconhecimento da Nla proteinase esta sublinhada. Os aminoácidos (G, A ou V) encontrados na 1ª posição da capa são apresentados. UFLA, Lavras-MG, 2003.

Na árvore filogenética com bootstrap (Figura 9), obtida com 2.000 repetições, observou-se a divisão também em dois grupos. Todos os quatro isolados comuns e, ao contrário do esperado, os quatro isolados necróticos caracterizados neste trabalho, foram reunidos no grupo II, com 58% de confiança com os isolados pertencentes às estirpes PVY<sup>O</sup> e PVY<sup>C</sup>, sendo estes ainda divididos em dois subgrupos (IIA e IIB). O isolado YN-UFLA (mais antigo, obtido em 1987 em campo de batata consumo da região Sul do Estado de Minas Gerais), se agrupou com os isolados recombinantes da França (pvyn-Fr) e da Coreia (yVN-Kor) (Revers et al., 1996). O YO-28Sp apresentou identidade de 100% com o isolado também brasileiro PVY-OB<sub>r</sub> (Inoue-Nagata et al., 2001) (Anexo B, tabela 5, diagonal inferior). Os demais (YNBr-Mg, YNBr2-Mg, YN-404Sp, YO-07Mg, YO229Sp e YOATLMg) apresentaram as identidades de 100% com o isolado yo-Can (Canadá). Ao contrário do observado para os isolados aqui estudados, o isolado brasileiro, PVY-NBr (Inoue-Nagata et al., 2001), se localizou no grupo dos necróticos (I), apresentando identidades que variaram de 86%, com o YNBr-Mg, YNBr2-Mg, YN-404Sp, YO-07Mg, YO229Sp e YOATLMg a 91% com os isolados YNUFLA e YO28Sp (Anexo B, tabela 5, diagonal inferior).

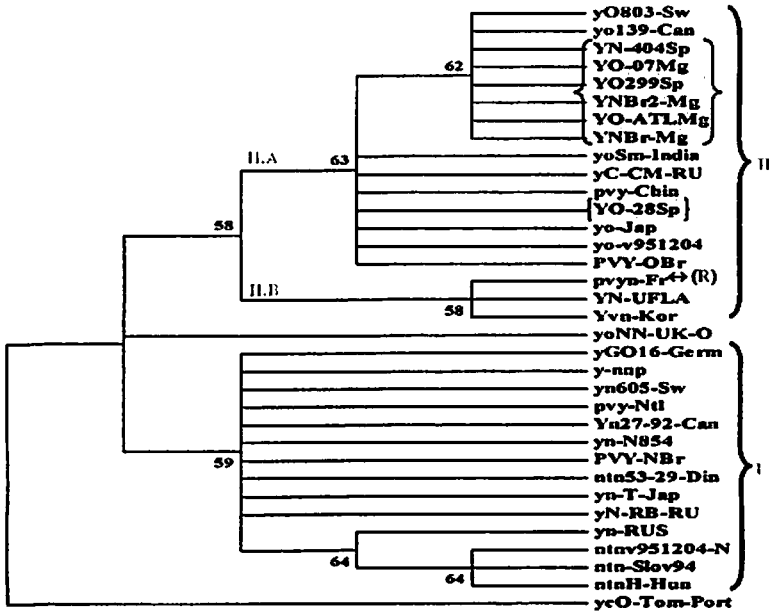


FIGURA 9. Árvore filogenética obtida com base nas seqüências de aminoácidos dos últimos 23aa da região C-terminal Nib de diferentes isolados de PVY. (R)= PVY<sup>N:O</sup>, serogrupo O,C. Valores de bootstrap, acima de 50% obtidos com 2.000 repetições, com o programa MEGA ver. 2.1. UFLA, Lavras-MG, 2003.

## 5.2.2 Comparação da região N-terminal da capa - CP (primeiros 158aa.)

A identidade observada na região N-terminal CP (Anexo B, tabela 6) entre os oitos isolados estudados variou de 93%, entre YO229Sp e YNBr2-Mg, a 98%, comparando-se o YNBr-Mg com o YN404Sp, YO-07Mg e YOATLMg, também o YN404Sp com o YO-07Mg, YOATLMg e YO-28Sp, e o YO-07Mg com o YOATLMg. O alinhamento múltiplo desses com outros 59 isolados já publicados (Anexo B, tabela 2) foi realizado na mesma região e com os mesmos 158aa., exceto o isolado pvy18-Austl (Shukla et al., 1988), que não possui um resíduo na posição 26. Na árvore filogenética com bootstrap (Figura 10), obtida com 2.000 repetições, verificou-se que, a exemplo do verificado anteriormente para a N1b, os isolados se dividiram em dois grupos (I e II), conforme o descrito por Revers et al. (1996). O grupo I, mais homogêneo, foi composto por isolados PVY<sup>NNTN</sup>; enquanto que o grupo II, bem maior e mais heterogêneo, foi formado por isolados de batata PVY<sup>O</sup>, PVY<sup>C</sup>, PVY<sup>N:O</sup> (serogrupo PVY<sup>O,C</sup>) e de pimentão, fumo, tomate e *S. melongena*.

Os isolados aqui estudados foram reunidos no grupo II, com 89% de confiança, juntamente com os necróticos recombinantes (N:O) do serogrupo PVY<sup>O,C</sup>: pbyn-Wi (Batata 'Wilga', PVY<sup>N:O</sup> da Polônia, Chrzanovska, 1991; Chachulska et al., 1997); pbyn-Fr (França, Batata, Robaglia et al., 1989; Revers et al., 1996); pvy-Chl (fumo, Chile, Sudarsono et al., 1993) e ynl-136 (batata, Canadá, McDonald & Singh, 1996). No grupo II também se encontra o isolado brasileiro PVY-OBR (Batata, Inoue-Nagata et al., 2001), o sul americano yo-Arg (Batata, Argentina, Bravo-Almonacid & Mentaberry, 1989), o yo36-Jap (Japão, Hataya et al., 1994), o de pimentão pvy-P21 (Tunísia, Fakhfakh et al., 1995) e os australianos de fumo (y18-Austl) e tomate (y43-Austl) (Shukla et al., 1986; 1988), entre outros. O YO-229Sp ficou reunido com os isolados norte americanos yo139-Can (Batata, Canadá) e pvyo-US (Batata, USA, Sudarsono et al., 1993).



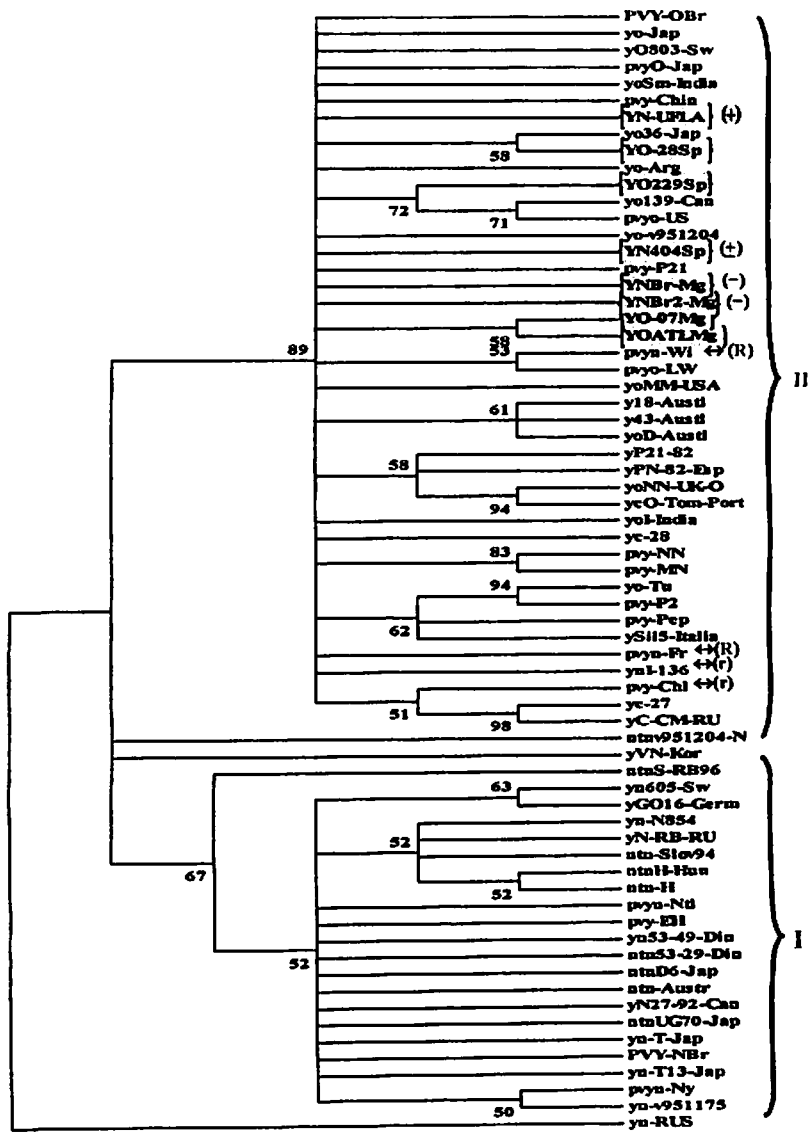


FIGURA 10. Árvore filogenética obtida com base nas seqüências de aminoácidos da região N-terminal CP de diferentes isolados de PVY. Valores de bootstrap obtidos com 2.000 repetições (R) = Serogrupo PVY<sup>O,C</sup> e PVY<sup>N,O</sup> com sítios de recombinação reconhecidos e (r) = não reconhecidos. (+, -, ±). Reação monoclonal PVY<sup>N</sup> (26000-Agdia). UFLA, Lavras-MG, 2003.

### 5.2.3 Comparação entre sequências de aminoácidos da região N-terminal da proteína da capa – CP.

Devido à alta identidade apresentada na região N-terminal da CP pelos isolados necróticos (YNBr-Mg, YNBr2-Mg, YN-UFLA e YN404Sp) aqui estudados, com isolados do grupo comum (PVY<sup>O</sup>), recombinantes (PVY<sup>N:O</sup>) e um isolado de pimentão (PVY-P21), todos serogrupo PVY<sup>O,C</sup>, optou-se por realizar um alinhamento múltiplo com outros 46 isolados publicados. Como anteriormente observado, os isolados foram divididos em dois grupos distintos (Figura 11). O primeiro (I - abaixo da linha), mais homogêneo, foi formado pelos isolado PVY<sup>N/NTN</sup>. O segundo (II - acima da linha), mais heterogêneo, foi constituído pelos oito isolados estudados e por todos os pertencentes aos PVY<sup>O</sup>, PVY<sup>C</sup>, PVY<sup>N:O</sup>, pimentão e isolados de outras hospedeiras (*Solanaceas*).

Os aminoácidos nas posições 1 (Alanina/Valina e Glicina), 11 (Serina/Asparagina e Treonina), 17 (Prolina/Leucina e Glutamina), 26 (Prolina/Serina e Leucina), 29 (Glicina e Ácido glutâmico), 31 (Ácido aspártico e glutâmico), 36 (Alanina e Valina), 98 (Arginina e Glutamina), 99 (Metionina/Valina e Leucina), 128 (Valina e Isoleucina) e 138 (Asparagina/Serina e Ácido aspártico), sinalizados com uma seta (↓), tenderam a separar os dois grupos, como já comentado por outros autores (Ohshima et al., 1991; Sudarsono et al., 1993; van der Vlugt, et al., 1993; Hataya et al., 1994; Chachulska et al., 1997; McDonald et al., 1997; Boonham et al., 2002b; Glais et al., 2002; Moury et al., 2002). Alguns desse aminoácidos foram estatisticamente comprovados como sendo possíveis sítios de recombinação (Revers et al., 1996). Observou-se ainda isolados com aminoácidos característicos do outro grupo em algumas dessas posições, como o resíduo 26 onde o YN-UFLA e três outros isolados do grupo I, o yo36-Jap (Japão), o pvyo-US (Batata, USA) e o yo-Arg (Argentina) apresentaram leucina (L), como os componentes do grupo II.

Os recombinantes N:O, pertencentes ao sorogrupo PVY<sup>O,C</sup> apresentaram as maiores identidades com os isolados necróticos estudados, YNBr-Mg, YNBr2-Mg, YN404Sp e em especial o YN-UFLA, que induziu os sintomas típicos de necrose das nervuras em fumo e reagiu com o anticorpo monoclonal para estirpes necróticas (Moraes et al., 1999). Glais et al. (2002), utilizando análises moleculares, demonstraram que os recombinantes PVY<sup>N:O</sup> são divididos em dois serogrupos, sendo o primeiro o PVY<sup>O</sup> no qual se encontram os isolados Padrão Wilga (YN-Wi e YN242), e o PVY<sup>N</sup>, característico dos PVY<sup>N:NTN</sup>. As identidades observadas entre os isolados estudados com os publicados variaram de 87 a 99% (Anexo B, tabela 6), sendo as menores verificadas entre o isolado YNBr2-Mg e a maioria dos isolados necróticos, com os quais se efetuou a comparação. O isolado YO229Sp também apresentou baixa identidade com os isolados PVY-NBR (Brasil, Inoue-Nagata et al., 2001), yn-T13-Jap e pvyn-Ny. A maior identidade, de 99% foi observada entre o YNBr-Mg e o isolado pvy-P21 (Pimentão, Tunísia), que tem sido caracterizado como pertencente ao serogrupo PVY<sup>O,C</sup> (Fakhfakh et al., 1995; Ounouna et al., 2002).

Inoue-Nagata et al. (2001), estudando a região da capa de dois isolados brasileiros de batata (PVY-NBR e PVY-OBR), observaram que estes apresentaram identidade de 95,1% entre si. Comparando o PVY-NBR com os quatro necróticos aqui estudados, verificaram-se identidades de 87 a 90% (Anexo B, tabela 6), caracterizando uma alta variabilidade entre eles. Já para o isolado PVY-OBR, a identidade mínima foi de 94%, com YN-UFLA e YNBr2-Mg, e máxima de 97%, com o isolado YO-28S. Segundo van Regenmortel et al. (2000), alguns dos critérios adotados pelo ICTV, para agrupar isolados de vírus como espécies distintas dentro da família *Potyviridae*, são: identidade <85% para a sequência completa, <75% para a 3'NTR, <85% para a sequência de aminoácidos da proteína da capa, reação distinta com anti-soros e em espécie de planta hospedeira padrão.

	1	11	17	24	29	31	36	
	↓	↓	↓	↓ ↓	↓ ↓	↓ ↓	↓	
YN-UFLA	A	ENS	P	S.L	G.D	A		
yo36-Jap	A	NS	P	S.L	GND	A		
YO-28Sp	A	NS	P	S.P	G.D	A		
PVY-OBPr	A	N.R	P	S.P	G.D	A		
yo-Jap	A	GN.R	L.D	S.P	G.D	A		
yO803-Sw	A	S.R	P	S.P	G.D	A		
yoSm-India	A	N	P	S.P	G.D	A.F	P	
pvy-Chin	A	V.DN	P	S.P	G.E	A	P	
pvyN-Wi	A	E.S	P	L.P	G.D	A		
pvyo-LW	A	E.S	V.P	L.P	G.D	A		
yP21-82	A	ENN	P	R.P	G.E	A		
yoNN-UK-O	A	ENS	P	R.P	G.D	A		
ycO-Tom-Port	A.E	ENS	P	R.P	G.D	A		
yc-28	A	NS	P	P.P	G.D	A		
yo-Tu	A	S	L	PSS	G.D	A		
pvy-P2	A	S	L	PSS	G.D	A		
pvy-Pep	A	S	P.D	PSS	G.D	A		
pvy-NN	A.K	ENS	P	PSS	G.E	A	A.I	
pvy-MN	A	ENS	P	PKP	V.D	A	A	
y43-Aust1	A	E.S	P	PAP	G.D	A	A.R	
yoD-Aust1	A	E.S	RP	V.P	G.D	A	A.R	
YNBr-Mg	A	E.S	RP	S.P	G.D	A	A	
YNBr2-Mg	A	V.E.S	RP	S.P	G.D	A	T	
pvy-P21	A	E.S	RP	S.P	G.D	A		
YO-07Mg	A	S.Y	RP	S.P	G.D	A	T	
YOATLMg	A	S	RP	S.P	G.D	A	T	
yo-v951204	A	S	RP	S.P	GRD	A		
YN404Sp	A	S	RP	S.P	G.D	A		
yc-27	V.E	S	RP	S.P	G.D	V	Q	
yC-CM-RU	V	S	RP	S.P	G.D	V	Q	
pvy-Chl	A	S	T.P	P.P	G.D	V	T	
ynI-136	A	S	RP	S.P	G.D	V		
yo139-Can	A	N	T.P.S	S.P	G.D	A		
pvyo-US	A	N	T.P.S	S.LI	G.D	A		
YO229Sp	A	N	TRP	S	S.P	GID	A	
yo-Arg	A	NN	P.S	S.L	G.D	V	R	
pvyN-Fr	A	N	P	P.P	G.D	A	T	
ntnUG70-Jap	G	T	Q	P.L	E.E	V		
ntn-Austr	G	T	Q	P.L	E.E	V		
pvy-EH	G	T	Q	I.P.L	E.E	V		
yN27-92-Can	G	T	Q	P.LI	E.E	V		
PVY-NBr	G	T	Q	PKL	E.E	V		
pvyN-Ny	G	T	Q	PIL	E.E	V		
yn-T13-Jap	G	T	Q	PSL	E.E	V		
pvyN-Nt1	G	T	Q	P.L	E.V	V		
yN-RB-RU	G	T	Q	P.L	E.E	V		
ntn-Slov94	G	T	Q	L.L	E.E	V		
ntnH-Hun	G	T	Q	P.L	E.E	V		
ntn-H	G	T	Q	P.L	NG.E	V		
yn605-Sw	G	T	Q	P.L	E.E	V	K	
yGO16-Germ	G	T	Q	P.L	E.E	V	K	
ntnv951204-N	G	T	Q	P.L	E.E	V		
yVN-Kor	G	T	Q	I.P.P	E.E	V	T	
yn-RUS	G	T	Q	V.P.L	E.E	A	R	
Consenso	NdtIdaggs	Kkdak	EQgsIQ	n	nk	k	KDVN	GTsGTHtVpRIkAITsKmrMPkSK

FIGURA 11. Ver título na próxima página.

**FIGURA 11.** Alinhamento múltiplo de aminoácidos da região N-terminal da proteína da capa de diferentes isolados de PVY. Os isolados seqüenciados neste trabalho estão em destaque. A linha separa os grupos I (abaixo) e II (acima), de acordo com Revers et al., (1996). Os pontos nas seqüências equivalem aos aminoácidos consenso para todos (letras maiúsculas na última linha) e para a maioria (letras minúsculas). A seta ↓ indica posições que tendem a separar os grupos e a ↓ parcialmente separam. UFLA, Lavras-MG, 2003. ...*(continua)*...

	↓	↓↓	
<b>YN-UFLA</b>	. . A . . . . . G . . . . .		RM . . . . .
yo36-Jap			RM . . . . .
<b>YO-28Sp</b>			RM . . . . .
PVY-OBr			RM . . . . .
yo-Jap			RM . . . . .
yo803-Sw			RM . . . . .
yoSm-India			RM . . . . .
pvy-Chin			RM . . . . .
pvyn-Wi			RM . . . . .
pyo-LW			RM . . . . .
yP21-82	. TA . . . . .		RV . . . . .
yoNN-UK-O	. TA . . . . .		RV . . . . N . . . .
ycO-Tom-Port	. TA . . . . .		RV . . . . N . . . .
yc-28	. . A . . . . .		RV . . . . .
yo-Tu	. . AA . . . . .		RM . . . . .
pvy-P2	. . AA . . . . .		RM . . . . .
pvy-Pep	. . AA . . . . .		RM . . . . .
pvy-NN	. . A . . . D . . . . .		RV . . . . .
pvy-MN	. . A . . . D . . . D . . . . .		RV . . . . .
y43-Aust1	. . AA . . . . .		RM . . . . . D . . . . .
yoD-Aust1	. . . . H . . . . .		RM . . . . . D . . . . .
<b>YNBr-Mg</b>			RM . . . . .
<b>YNBr2-Mg</b>			RM . . . . . S . . . . .
pvy-P21			RM . . . . .
<b>YO-07Mg</b>			RM . . . . .
<b>YOATLMg</b>			RM . . . . .
yo-v951204			RM . . . . .
<b>YN404Sp</b>	. . A . . . . .		RM . . . . .
yc-27			RV . . . . .
yc-CM-RU			RV . . . . .
pvy-Chl			RV . . . . S . . . .
ynI-136			RM . . . . .
yo139-Can	. . A . . . . .		RM . . . . .
pyo-US	. . A . . . . .		RM . . . . .
<b>YO229Sp</b>	. . A . . . . .		RM . . . . .
yo-Arg	. VAA . . . . .		RM . . . . Q . . . .
pvyn-Fr			RM . . . . .
ntnUG70-Jap			QL . . . . .
ntn-Austr			QL . . . . .
pvy-EH			QL . . . . .
yn27-92-Can			QL . . . . .
PVY-NBr			QL . . . . .
pvyn-Ny			QL . . . . .
yn-T13-Jap			. K . . . . QL . . . . .
pvyn-Ntl			. E . . . . QL . . . . .
yn-RB-RU	. . . . K . . . . .		QL . . . . .
ntn-Slov94	. . . . K . . . . .		QL . . . . .
ntnH-Hun	. . A . . . K . . . . .		QL . . . . .
ntn-H	. . A . . . K . . . . .		QL . . . . .
yn605-Sw			QL . . . . .
yG016-Germ			QL . . . . .
ntnv951204-N			RM . . . . .
yVN-Kor			RM . . . . .
yn-RUS			ERM . . . . .
<b>Consenso</b>	<b>GatvLnLeHLLeYAPQIdiSNTRATQSQFDWYeAv</b>		<b>AYDIGeEMPTVMnGLMVWCI</b>

FIGURA 11 ...(continua)...

	128	138	158
	↓	↓	
<b>YN-UFLA</b>	V	N	
yo36-Jap	V	N	
<b>YO-28Sp</b>	V	N	
PVY-OBr	V	D	
yo-Jap	V	N	
yO803-Sw	V	N	
yoSm-India	V	N	
pvy-Chin	V	N	G
pvyn-Wi	V	N	
pvyo-LW	V	N	
yP21-82	V	S	
yoNN-UK-O	V	N	
yoO-Tom-Port	V	N	
yc-28	V	EN	
yo-Tu	I	S	
pvY-P2	I	S	
pvY-Pep	V	S	
pvY-NN	I	S	
pvY-MN	I	S	
y43-Aust1	V	N	
yoD-Aust1	V	N	
<b>YNBr-Mg</b>	V	N	
<b>YNBr2-Mg</b>	V	N	
pvY-P21	V	N	
<b>YO-07Mg</b>	V	N	
<b>YOATLMg</b>	V	N	N
yo-v951204	V	N	
<b>YN404Sp</b>	V	N	
yc-27	I	N	
yC-CM-RU	I	N	
pvY-Chl	I	N	
ynI-136	V	D	
yo139-Can	V	N	
pvyo-US	V	N	
<b>YO229Sp</b>	V	N	
yo-Arg	I	N	
pvyn-Fr	V	N	
<hr/>			
ntnUG70-Jap	I	D	I
ntn-Austr	I	D	
pvY-EH	I	D	
yN27-92-Can	I	D	
PVY-NBr	I	D	
pvyn-Ny	I	DD	
yn-T13-Jap	I	D	
pvyn-Ntl	I	D	
yN-RB-RU	I	D	
ntn-Slov94	I	D	
ntnH-Hun	I	D	
ntn-H	I	D	
yn605-Sw	I	N	
yGO16-Germ	I	K	
ntnv951204-N	V	N	
yVN-Kor	V	N	
yn-RUS	V	N	
<b>Consenso</b>	<b>ENGTSPN NGVWVMDg</b>	<b>eQveYPLkPIVENAKPtLRQ</b>	

FIGURA 11, cont.

No primeiro aminoácido da proteína da capa, os oito isolados seqüenciados neste trabalho, bem como a maioria dos isolados do grupo II apresentaram o aminoácido alanina (A), característico dos grupos PVY<sup>O,C</sup>, recombinantes (N:O) e PVY oriundos de pimentão, enquanto os isolados PVY<sup>NNTN</sup> (grupo I) iniciaram com a Glicina (G) nessa mesma posição (van der Vlugt et al., 1993; Chachulska et al., 1997). O yc-27 da Alemanha (Blanco-Urgoiti et al., 1998a) e yC-CM-RU do Reino Unido (Boonham et al., 2002b), pertencentes ao PVY<sup>C</sup>, apresentaram V (Valina) nessa mesma posição, o que, segundo Blanco-Urgoiti et al. (1998a), isto representaria um novo sítio de processamento da NIa proteinase, não relatado anteriormente para PVY e bastante raro na família *Potyviridae*.

A região de reconhecimento vírus-vetor DAG (posição 6-8) permaneceu conservada em todos os isolados, exceto nos isolados: YNBr2-Mg, que apresentou valina, (V) um aminoácido neutro, não-polar, na posição 6, ao invés do ácido aspártico (D); pvyo-US com asparagina (N) no lugar de alanina (A) (Sudarsono et al., 1993); PVY-NBR (Batata, Brasil) com treonina (T) na posição da glicina (G) (Inuo-Nagata et al., 2001); pvy-Chin (China) com V no lugar de G (Zhou et al., 1990; Ohshima et al., 1991). A região da proteína da capa não é essencial à replicação e ao movimento célula a célula para alguns *Potyvirus* (Rojas et al., 1997); entretanto, sabe-se que após transmissões mecânicas sucessivas, esses podem apresentar mutações nesta parte do genoma, afetando qualitativamente algumas de suas funções, como, por exemplo, a transmissão pelo afídeo (Atreya et al., 1990; 1995; López-Moya et al., 1999; Froissart et al., 2002) e os movimentos célula a célula e a longa distância (Rojas et al., 1997; López-Moya & Pirone, 1998). Atreya et al. (1995), estudando a natureza do motif DAGX na proteína da capa do *Tobacco vein mottling Potyvirus* (TVMV) através da mutação, verificaram que a perda do ácido aspártico (D) ou asparagina (N) no primeiro aminoácido resultou em perda na taxa de



transmissão por afideo. Como o YNBr2-Mg é um variante do YNBr-Mg original, que foi recuperado de plantas de *P. floridana* com sintomas diferentes, pode ser que esse tenha sofrido algumas modificações em seu genoma, devido às transmissões mecânicas realizadas para a manutenção do inóculo.

Na posição 9, verificou-se a presença de ácido glutâmico (E) para YN-UFLA, YNBr-Mg e YNBr2-Mg e também para os isolados de: batata: pvyn-Wi (PVY<sup>N:O</sup> da Polônia), pvyo-LW (Polônia), yoNN-UK-O (Reino Unido), yoD-Austl (Austrália); pimentão: yP21-82 e pvy-P21 (Tunísia); fumo: pvy-NN e pvyMN (ambos dos USA); tomate: ycO-Tom-Port (Portugal) e y43-Austl (Austrália).

O resíduo de asparagina (N) na posição 10 está presente em YN-UFLA e YO-28Sp e também nos isolados yo36-Jap (Japão), yoMM-USA (Fumo), yP21-82 (Pimentão), yoNN-UK-O (Batata), ycO-Tom-Port (Tomate), yc-28 (Alemanha; infecta pimentão), pvy-NN (Fumo), pvyMN (Fumo) e yo-Arg (Batata, Argentina). Esse mesmo resíduo, na posição 11 também é característico do isolado YO229Sp como para PVY-OBR (Batata, Brasil), pvyo-Jap, yoSm-Índia (*Solanum melongena*), pvy-Chin, yoMM-USA, yP21-82, yo139-Can (Batata, Canadá), pvyo-US (Batata, USA), yo-Arg e o recombinante da França (pvyn-Fr). Curiosamente, na posição 13 observou-se a presença de arginina (R), apenas em PVY-OBR, pvyo-Jap e yo803-Sw (Suíço).

O YO229Sp, juntamente com os isolados yo139-Can e pvyo-US, apresentaram aminoácidos comuns nas posições 15 (Treonina) e 20 (Serina) e, conforme comentado anteriormente, estes dados sugerem que eles podem ter a mesma origem geográfica, principalmente se for considerado que o YO229Sp é oriundo de batata semente básica 'Atlantic', importada do Canadá (Tabela 1). Os isolados pvy-Chl e yo-Arg também apresentaram tais resíduos nas respectivas posições.

Na posição 16, observou-se um resíduo arginina (R) encontrado nos isolados necróticos YNBr-Mg, YNBr2-Mg, YN404Sp e os comuns YO-07Mg, YOATLMg e YO229, estudados aqui, e mais os isolados: pvy-P21, pimentão da Tunísia (Fakhfakh et al., 1995); yo-v951204 de batata do Reino Unido (Boonham et al., 2002b); e os PVY<sup>C</sup>: yc-27 da Alemanha, que é transmitido por afídeo e não infecta pimentão (Blanco-Urgoiti et al., 1998a) e yC-CM-RU do Reino Unido (Boonham et al., 2002b). Da mesma forma, McDonald et al (1997) verificaram que o isolado I-136, caracterizado como possível recombinante, apresentou um resíduo de arginina (R), juntamente com isolado yoD-Austl (Shukla et al., 1988). Desde o primeiro relato, pode-se verificar que o número de isolados apresentando este resíduo tendeu a aumentar.

Na posição 24, o resíduo de aminoácido típico para o grupo I foi a prolina (P) e para o grupo II a serina (S). Entretanto, nota-se no grupo II certa variabilidade nessa posição, onde: nove isolados apresentaram resíduo de prolina, típico do grupo I; um apresentou um resíduo de valina (V); dois apresentaram resíduos de leucina (L); e três de arginina (R). Todos os oito isolados estudados aqui apresentaram serina nessa posição. No grupo I, apenas um isolado (ntn-slov94) apresentou um resíduo L ao invés do típico P.

Na posição 26, o isolado YN-UFLA, apresenta leucina (L), que é característico do grupo I (PVY<sup>NNTN</sup>), juntamente com os isolados yo36-Jap, pvyo-US e yo-Arg. Contrariamente, o isolado yVN-Kor (Coréia) possui um resíduo de prolina (P), típico do grupo II. Sudarsono et al. (1993) observaram que o isolado P (pvyo-US), que causava mosaico em fumo, juntamente com os isolados necróticos da Holanda (van der Vlug et al., 1989) e Alemanha (Wefels et al., 1989), possuíam leucina na posição 26.

Na posição 58 observaram-se quatro resíduos diferentes: Arginina (R) nos dois australianos e no yo-Arg; Alanina (A) para no YNBr-Mg; Treonina (T) no YNBr2-Mg, YO-07Mg, YOATLMg, pvy-Chl e pvyn-Fr do grupo II e yVN-

Kor do grupo I; e Glutamina (Q) para yc-27 e yC-CM-RU. Na posição 63 verificou-se alanina (A) para os isolados YN-UFLA, YN404Sp, YO229Sp e em 13 outros isolados do grupo II e dois representantes do grupo I. Esse mesmo resíduo é verificado em cinco isolados do grupo II, na posição 64. Já na posição 72, detectou-se um resíduo de glicina para YN-UFLA, alteração essa que foi primeiramente relatada para yo-Jap (Ohshima et al., 1991).

É interessante observar que, depois da 24, a posição 128 é a que apresenta o segundo maior número de isolados do grupo II com aminoácidos característicos do grupo I (oito isolados com I ao invés de V).

Entre os isolados característicos do grupo I, as maiores diferenças foram visualizadas nas posições 55 e 68 com lisina (K) (Figura 11). Finalmente, pode-se ainda observar que os três últimos isolados necróticos do grupo I (yVN-Kor, yn-Rus e ntnv951204-N) apresentam aminoácidos característicos do grupo II nas posições 26, 36, 98, 99, 128 e 138, o que sugere que estes podem ser intermediários entre o grupo I e II, logo após o pvy-Fr, conforme o agrupamento mostrado na figura 10.

### **5.3 Evidência de possível recombinação gênica (Características Biológicas X Moleculares).**

Estudando a variabilidade genômica entre isolados de PVY, Glais et al. (2002) verificaram nas regiões 5'NTR e P1, que dois isolados recombinantes padrão Wilga (YN242-Fr e YN-Wi) se comportaram de modo diferente. O primeiro apresentou padrão semelhante aos isolados necróticos e ao recombinante I-136 (McDonald et al., 1996), o que também pode ser observado para o YNBr-Mg, YN21Sp, YN404Sp e atipicamente para o YO-07Mg. O segundo foi semelhante aos isolados característicos PVY<sup>O</sup>, como os isolados YO229Sp, YOATLMg, YO-28Sp e atipicamente para o YN-UFLA. O comportamento dos isolados YO-07 e YN-UFLA, com características biológicas

e sorológicas respectivamente típicas dos grupos comum e necrótico, e também o fato de os isolados YN404 e YNBr-Mg, com características biológicas atípicas aos necróticos (Tabela 2, Cap. 02), apresentarem-se agrupados com isolados necróticos oriundos de países da Europa (Figuras 4 e 6), sugerem que esses isolados poderiam ser resultantes de uma possível recombinação, nas duas regiões, e que essas não seriam determinantes de sintomatologia, em *Physalis floridana* e nas cultivares de *Nicotiana tabacum*, capazes de separar os grupos.

O mesmo foi detectado na região N-terminal da capa, pois os isolados necróticos (YN-UFLA, YN-404Sp, YNBr-Mg e YNBr2-Mg) apresentaram alta identidade com isolados dos grupos PVY<sup>O</sup> e recombinantes, sendo também essa região considerada como não determinante de sintomatologia em plantas de *P. floridana*, e de acordo com Glais et al. (2002), em plantas de fumo. É interessante observar que a maioria dos isolados recombinantes PVY<sup>O:N</sup> serogrupo PVY<sup>O,C</sup> que possuem sítios de recombinação reconhecidos apresentam características biológicas e sorológicas atípicas.

Verificando minuciosamente a região responsável pela antigenicidade, localizada entre os primeiros 40 aminoácidos da N-terminal da proteína da capa, observa-se que o resíduo encontrado nessa posição (26-Leucina) talvez seja responsável pelas diferentes reações aos anticorpos monoclonais verificados entre os necróticos YNBr-Mg, YNBr2-Mg, YN404Sp e YN-UFLA, estudados aqui (Tabela 1). Ohshima et al. (1991) verificaram que a sequência <sub>24</sub>P-L--E-----V<sub>30</sub> foi conservada para alguns isolados com característica de necrótico. Chachulska et al. (1997), comparando a sequência de aminoácidos da proteína da capa de três isolados de PVY da Polônia com mais 20, previamente publicados, sugerem uma possível localização de epitópos antigênicos estirpe-específicos nas posições 9-17 (GSTKKDAKQ) e 24-31(PNLNKEKE), presentes no grupo de isolados caracterizados PVY<sup>N:NTN</sup>, e ausentes nos PVY<sup>O,C</sup>, PVY<sup>N:O</sup> (recombinantes) e isolados de pimentão e outras *solanaceas*.

Dentre os possíveis sítios de recombinação reconhecidos (Revers et al., 1996; Boonham et al., 2002b; Glais et al., 2002; Moury et al., 2002), a região N-terminal CP, sequenciada neste trabalho, envolve aquela verificada para os isolados yVN-Kor e yN-RUS (Revers et al., 1996) e para ntntRB-96 (Boonham et al., 2002b). Contudo, nenhum dos oito isolados estudados apresentaram esses sítios, principalmente os necróticos (YNBr-Mg, YNBr2-Mg, YN-UFLA e YN404Sp), que se comportaram, na maioria dos alinhamentos, como pertencentes ao sub-grupo II (PVY<sup>O</sup>), proposto por Revers et al. (1996). Segundo Worobey & Holmes (1999), a recombinação é caracterizada como uma mudança de material genético entre duas viroses, duas estirpes e/ou também entre o vírus e o hospedeiro, e que a evidência indireta da recombinação de RNA é demonstrada a partir da comparação dos genomas virais. A grande variabilidade genética detectada na natureza tem sido creditada, por alguns autores, à recombinação gênica entre as estirpes.

A maioria dos resíduos citados na figura 7 (alguns com setas ↓ e ↓), como, por exemplo, nas posições 1 (A), 9 (E), 10 (N), 11 (S), 15 (A), 20 (G), 24 (R), 25(N), 31 (D), 36 (A), 52 (S), 58 (K), 62 (T), 63 (A), 64 (V), 99(V), 128 (V) e 138 (S), entre outras, foram estatisticamente comprovados como sendo passíveis de serem submetidos à seleção de diversificação entre isolados de PVY, verificando-se, por exemplo, que o aminoácido na posição 24 possui uma probabilidade maior de 95% de pertencer à categoria de seleção positiva (Moury et al., 2002). Curiosamente, esses autores não detectaram essa categoria para o resíduo de arginina (R) na posição 16 para PVY, como observado para *Potato virus A* (PVA) e *Bean yellow mosaic Potyvirus* (BYM). Contudo, os autores reconhecem a dificuldade de estabelecer, dentre as funções das proteínas, quais estariam envolvidas com os eventos de seleção positivos, pois a região N-terminal da CP é um maravilhoso exemplo de proteína viral com multifuncionalidade.

## 6 CONCLUSÕES

1. Considerando a seqüência de nucleotídeos da região 5'NTR e de aminoácidos da N-Terminal da proteína P1, os oitos isolados estudados foram separados em dois grupos, sendo: I, com o YN-21Sp, YN404Sp, YNBr-Mg e YO-07Mg e o II com YO-28Sp, YO229Sp, YOATLMg e YN-UFLA.

2. A localização dos isolados YO-07 e YN-UFLA nos grupos I (necrótico) e II (comum), respectivamente, sugere a possibilidade desses serem recombinantes.

3. A grande variabilidade da região N-terminal da CP dos isolados estudados, notadamente a dos necróticos, que foram agrupados juntamente com isolados pertencentes aos grupos Y<sup>OC</sup>, recombinantes Y<sup>N:O</sup> (serogrupo O,C), e um isolado de pimentão, foi considerado também como um indício da presença de isolados recombinantes no Brasil.

4. O agrupamento atípico de isolados necróticos (PVY<sup>N</sup>), junto com isolados comuns (PVY<sup>O</sup>), indicaram que as regiões 5'NTR, N-terminal da proteína P1, últimos 23aa. da C-terminal da Nib e N-terminal da proteína da capa não devem estar correlacionadas com os sintomas induzidos em plantas de *Physalis floridana* e fumo (*Nicotiana tabacum*), cvs. Turkish, Turkish NN (TNN) e Havana.

5. As quatro regiões genômicas para o isolado YO229Sp, apresentaram alta similaridade com o isolado yo139-Can, do Canadá, sugerindo uma origem geográfica em comum.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ATREYA, C.D.; RACCAH, B.; PIRONE, T.P. A point mutation in the coat protein abolishes aphid transmissibility of a Potyvirus. *Virology*, New York, v.178, p.161-165, 1990.

ATREYA, P.L. et al. Mutational analysis of the coat protein N-terminal amino acids involved in potyvirus transmission by aphids. *Journal of General Virology*, Great Britain, v.76, pt.2, p.265-70, Feb. 1995.

BECZNER, L. et al. Studies on the etiology of tuber necrotic ringspot disease in potato. *Potato Research*, Wageningen, v.27, p.339-352, 1984.

BLANCO-URGOITI, B. et al. Characterization of potato potyvirus Y (PVY) isolates from seed potato batches. Situation of the NTN, Wilga and Z isolates. *European Journal of Plant Pathology*, Netherlands, v.104, n.8, p.811-819, 1998b.

BLANCO-URGOITI, B. et al. Potato virus Y group C isolates are a homogeneous pathotype but two different genetic strains. *Journal of General Virology*, Great Britain, v.79, pt.8, p.2037-42, Aug. 1998a.

BOONHAM, N. et al. Biological and sequence comparisons of Potato virus Y isolates associated with potato tuber necrotic ringspot disease. *Plant Pathology*, Oxford, v.51, n.2, p.117-126, Apr. 2002b.

BOONHAM, N. et al. Potato virus Y from *Petunia* can cause symptoms of potato tuber necrotic ringspot disease (PTNRD). *European Journal of Plant Pathology*, Netherlands, v.105, n.6, p.617-621, 1999.

BOONHAM, N. et al. The detection of tuber necrotic isolates of Potato virus Y, and the accurate discrimination of PVY(O), PVY(N) and PVY(C) strains using RT-PCR. *Journal of Virological Methods*, v.102, n.1-2, p.103-12, Apr. 2002a.

BRAVO-ALMONACID, F.; MENTABERRY, A.N. Nucleotide cDNA sequence coding for the PVY<sup>o</sup> coat protein. *Nucleic Acids Research*, Oxford, v.17, n.11, p.4401, 1989.

BRIOSO, P.S.T. et al. Detecção de vírus da batata em plantas infectadas e em afídeos virulíferos através dos testes de "Polymerase Chain Reaction" e de "Dot-blot". **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.21, n.3, p.328-335, 1996.

CARRINGTON, J.C.; FREED, D.D.; OH, C.S. Expression of potyviral polyproteins in transgenic plants reveals three proteolytic activities required for complete processing. **EMBO Journal**, v.9, n.5, p.1347-1353, 1990.

CEROVSKÁ, N. et al. Nucleotide sequences of 5'-terminal parts of coat protein genes of various isolates of NTN strain of potato virus Y. **Acta Virologica**, v.45, n.1, p.55-9, Feb. 2001.

CHACHULSKA, A.M. et al. Tobacco vein necrosis determinants are unlikely to be located within the 5' and 3' terminal sequences of the potato virus Y genome. **Archives of Virology**, Austria, v.142, n.4, p.765-770, Apr. 1997.

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

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

DE BOKX, J.A.; HUTTINGA, H. **Potato virus Y** Kew, England: Commonw. Mycol. Inst. / Asso. Appl. Biology, 1981. (Descriptions of Plant Viruses. No. 242).

FAKHFAKH, H. et al. Polymorphisme des régions capside et 3'-NTR de 3 isolats tunisiens du virus Y de la pomme de terre (PVY). **Agronomie**, Paris, v.15, n.9-10, p.569-79, 1995.

FIGUEIRA, A.R.; PINTO, A.C.S. Estirpe necrótica do vírus Y da batata em sementes importadas esta causando problemas ao bataticultor mineiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.20, p.299, Ago. 1995 (Suplemento).

FROISSART, R.; MICHALAKIS, Y.; BLANC, S. Helper Component-Transcomplementation in the transmission of plant viruses. **Phytopathology**, v.92, n.6, p.576-579, June, 2002.

GLAIS L, TRIBODET M. et al. RFLP mapping of the whole genome of ten viral isolates representative of different biological groups of potato virus Y. **Archives of Virology**, Austria, v.143, n.11, p.2077-91, Nov. 1998.



GLAIS, L.; TRIBODET, M.; KERLAN, C. Genomic variability in Potato potyvirus Y (PVY): evidence that PVY(N)W and PVY(NTN) variants are single to multiple recombinants between PVY(O) and PVY(N) isolates. *Archives of Virology*, Austria, v.147, n.2, p.363-78, 2002.

HATAYA, T. et al. Characterization and strain identification of a potato virus Y isolate non-reactive with monoclonal antibodies specific to the ordinary and necrotic strains. *Intervirology*, Switzerland, v.37, n.1, p.12-19, 1994.

INOUE-NAGATA, A.K. et al. Analysis of the nucleotide sequence of the coat protein and 3'-untranslated region of two Brazilian *Potato virus Y* isolates. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v.26, n.1, p.45-52, Mar. 2001.

JAKAB, G. et al. Infectious in vivo and in vitro transcripts from full-length cDNA clone of PVY-N605, a Swiss necrotic isolate of potato virus Y. *Journal of General Virology*, Great Britain, v.78, n.12, p.3141-3145, Dec. 1997.

JONES, R.A.C. Strain group specific and virus specific hypersensitive reactions to infection with potyviruses in potato cultivars. *Annals of Applied Biology*, Great Britain, v.117, n.1, p.93-106, 1990.

KERLAN, C. et al. Variability of potato virus Y in potato crops in France. *Journal of Phytopathology*, v.147, p.643-651, 1999.

LANE, L.C. A general method for detecting plant viruses. In: MARAMOROSCH, K. (Ed.). *Plant diseases of viral, viroid, mycoplasma and uncertain origin*. New Delhi: Oxford and IBH, 1992. Cap.1, p.3-17.

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

LÓPEZ-MOYA, J.J.; PIRONE, T.P. Charge changes near the N terminus of the coat protein of two potyviruses affect virus movement. *Journal of General Virology*, Great Britain, v.79, n. 1, p.161-165, 1998.

LÓPEZ-MOYA, J.J.; WANG, R.Y.; PIRONE, T.P. Context of the coat protein DAG motif affects potyvirus transmissibility by aphids. *Journal of General Virology*, Great Britain, v.80, n.12, p.3281-3288, 1999.

McDONALD, J.G. et al. Coat protein and 5' nontranslated region of a variant of potato virus Y. **Canadian Journal of Plant Pathology**, Guelph, v.19, n.2, p.138-144, 1997.

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

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

MORAVEC, T.; CEROVSKÁ, BOONHAM, N. The detection of recombinant, tuber necrosing isolates of Potato virus Y (PVY<sup>NTN</sup>) using a three-primer PCR based in the coat protein gene. **Journal of virological Methods**, v. 109, n.1, p. 63-68, Apr. 2003.

MOURY, B. et al. Evidence for diversifying selection in Potato virus Y and in the coat protein of other potyviruses. **Journal of General Virology**, Great Britain, v.83, n.10, p.2563-2573, 2002.

NADERI, M.; BERGER, P.H. Pathogenesis-related protein 1a is induced in potato virus Y-infected plants as well as by coat protein targeted to chloroplasts. **Physiol. Mol. Plant Pathol.** v.51, p.41-44, 1997.

NIE, X.; SINGH, R.P. A new approach for the simultaneous differentiation of biological and geographical strains of Potato virus Y by uniplex and multiplex RT-PCR. **Journal of Virological Methods**, v.104, n.1, p.41-54, June 2002b.

NIE, X.; SINGH, R.P. Probable geographical grouping of PVY(N) and PVY(NTN) based on sequence variation in P1 and 5'-UTR of PVY genome and methods for differentiating North American PVY(NTN). **Journal of Virological Methods**, v.103, n.2, p.145-56, May 2002a.

OHSHIMA, K. et al. Comparison of biological properties, serological characteristics and amino acid sequences of coat protein between potato virus Y ordinary strain and necrotic strain. **Annals of the Phytopathological Society of Japan**, v.57, p.615-622, Dec. 1991.

OUNOUNA, H. et al. Production of monoclonal antibodies against synthetic peptides of the N-terminal region of *Potato virus Y* coat protein and their use in PVY strain differentiation. *Plant Pathology*, Oxford, v.51, n.4, p.487-494, Aug. 2002.

REVERS, F. et al. Frequent occurrence of recombinant potyvirus isolates. *Journal of General Virology*, Great Britain, v.77, pt.8, p.1953-65, Aug. 1996.

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

ROBAGLIA, C. et al. Nucleotide sequence of *Potato virus Y* (N strain) genomic RNA. *Journal of General Virology*, Great Britain, v.70, n.4, p.935-947, 1989.

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

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. *Molecular Cloning*. 2<sup>nd</sup>.ed. New York: Cold Spring Harbor Press, 1989. 1546p.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COUSON, A.R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v.74, p.5463-546, 1977.

SHUKLA, D.D. et al. Coat protein of Potyviruses 4. Comparison of biological properties, serological relationship, and coat protein amino acid sequences of four strains of potato virus Y. *Archives of Virology*, Austria, v.102, p.207-219, 1988.

SHUKLA, D.D. et al. Coat protein of Potyviruses. 2. Amino acid sequence of the coat protein of Potato Virus Y. *Virology*, New York, v.152, p.118-125, 1986.

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

SHUKLA, D.D.; WARD, W. Structure of Potyvirus coat proteins and its application in the taxonomy of the Potyvirus group. *Advances in Virus Research*, v.36, p.273-314, 1989b.

SHUKLA, D.D; WARD, C.W. Identification and classification of potyviruses on the basis of coat protein sequence data and serology: Brief review. **Archives of Virology**, Austria, v.106, n.3-4, p.171-200, 1989a.

SUDARSONO, J.B.Y. et al. Nucleotide sequence of the capsid protein cistrons from six potato virus Y (PVY) isolates infecting tobacco. **Archives of Virology**, Austria, v.132, n.1-2, p.161-170, 1993.

THOLE, V. et al. Cloning and sequencing of potato virus Y (Hungarian isolate) genomic RNA. **Gene**, Amsterdam, v.123, n.2, p.149-156, 1993.

TORDO, V.M. et al. Sequence polymorphism in the 5'NTR and in the P1 coding region of potato virus Y genomic RNA. **Journal of General Virology**, Great Britain, v.76, n.4, p.939-949, Apr. 1995.

TURPEN, T. Molecular cloning of potato virus Y genome: nucleotide sequence homology in non-coding regions of potyviruses. **Journal of General Virology** Great Britain, v.70, n.8, p.1951-1960, Aug. 1989.

VAN DER VLUGT, R. et al. Nucleotide sequence of the 3'- terminal region of Potato Virus Y<sup>N</sup> RNA. **Journal of General Virology**, Great Britain, v.70, n.1, p.229-233, Jan. 1989.

VAN DER VLUGT, R.A.A.; LEUNISSEN, J.; GOLDBACH, R. Taxonomic relationships between distinct potato virus Y isolates based on detailed comparison of the viral coat proteins and 3'-nontranslated regions. **Archives of Virology**, Austria, v.131, n.3-4, p.361-375, 1993.

VAN REGENMORTEL, M.H.V. et al. (Ed.). **Virus taxonomy**. San Diego: Academic, 2000. p.3-16. (Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses).

VERCHOT, J.; CARRINGTON, J.C. Evidence that the potyvirus P1 proteinase functions in trans as an accessory factor for genome amplification. **Journal of Virology**, v.69, p.3668-74, 1995.

WEFELS, E. et al. Cloning of the potato virus Y genes encoding the capsid protein CP and the nuclear inclusion protein NIb. **Archives of Virology**, Austria, v.107, n.1-2, p.123-134, 1989.

WOROBAY, M.; HOLMES, E.C. Evolutionary aspects of recombination in RNA viruses. **Journal of General Virology Great Britain**, v.80, n.10, p.2535-2543, 1999.

ZHOU, X.R. et al. cDNA sequence of the 3' noncoding region of the PVY genome (the Chinese isolate). **Nucleic Acids Research, Oxford**, v.18, p.5554, 1990.

## ANEXOS

### ANEXO A

<b>Tabelas</b>	<b>Página</b>
<b>1 A - Análise de variância do comportamento de cultivares de batata, em relação a quatro isolados de PVY. UFLA, Lavras-MG, 2003.....</b>	<b>116</b>
<b>2 A - Análise de Dialéctica de severidade da doença (sem ajuste), envolvendo 17 cultivares de batata e quatro isolados de PVY. UFLA, Lavras-MG, 2003.....</b>	<b>116</b>

TABELA 1 A. Análise de variância do comportamento de cultivares de batata, em relação a quatro isolados de PVY. UFLA, Lavras-MG, 2003.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
CULT	16	17,800203	1,112513	23,455	0,0000
ISOL	3	2,635474	0,878491	18,521	0,0000
CULT*ISOL	48	6,954698	0,144890	3,055	0,0000
erro	204	9,676250	0,047433		
Total	271	37,066625			
CV	: 37,10%				
Média geral:	0,5870629				
R <sup>2</sup>	: 0,901				

TABELA 2 A. Análise de Dialélica de severidade da doença (sem ajuste), envolvendo 17 cultivares de batata e quatro isolados de PVY. UFLA, Lavras-MG, 2003.

FV	GL	SQ	QM	F
Tratamento	67	27,39	,408806	8,618598**
GRA(RH)	16	17,799953	1,112497	23,454073**
GAA(Agressiv.)	3	2,635494	,878498	18,52082**
SIA(Interação)	48	6,9545	,144885	3,054528**
RESÍDUO	204	9,676332	,047433	
Média de severidade da Doença (u):	,587074			
DP(u) :	,013206			

\*\* Significativo a 5% de probabilidade

## ANEXO B

Tabelas	Página
<b>1 B - Denominação e caracterização de isolados obtidos no GenBank e mais nove não inseridos (**), nas regiões referente a 5’NTR e/ou N-terminal P1.....</b>	<b>118</b>
<b>2 B - Denominação e caracterização de isolados obtidos no GenBank e mais dez não inseridos (**), nas regiões referente aos últimos 23aa. C-terminal da N1b e/ou N-terminal da CP.....</b>	<b>119</b>
<b>3 B - Porcentagem de identidade de nucleotídeos da região 5’NTR entre diferentes isolados de PVY, obtida através do múltiplo alinhamento utilizando o Clustal W. As menores identidades, entre os oitos isolados estudados, estão em negrito e as maiores, sublinhadas.....</b>	<b>121</b>
<b>4 B - Porcentagem de identidade de aminoácidos da região N-terminal da proteína P1 entre diferentes isolados de PVY, obtida através do alinhamento múltiplo utilizando o Clustal W. As menores identidades, entre os isolados estudados, estão em negrito e as maiores, sublinhadas.....</b>	<b>122</b>
<b>5 B - Porcentagem de identidade de aminoácidos da região dos últimos 23aa. C-terminal N1b e os primeiros 158aa da N-terminal CP (Diagonal superior) e somente dos últimos 23aa. C-terminal N1b (Diagonal inferior), entre diferentes isolados de PVY, obtida através do alinhamento múltiplo utilizando o Clustal W. As menores identidades entre os oitos isolados, estão em negrito e as maiores, sublinhadas.....</b>	<b>123</b>
<b>6 B - Porcentagem de identidade de aminoácidos da região N-Terminal CP entre diferentes isolados de PVY, obtida através do alinhamento múltiplo utilizando o Clustal W. As menores identidades, entre os oitos isolados estudados, estão em negrito e as maiores, sublinhadas.....</b>	<b>124</b>



TABELA 1 B. Denominação e caracterização de isolados obtidos no GenBank e mais nove não inseridos (\*\*), nas regiões referente a 5'NTR e/ou N-terminal P1. UFLA, Lavras-MG, 2003.

Isolado	Nº Acesso	Origem e hospedeira	Biologia	Região
yoLoi-Finl	AJ245554	Loimaan - Finlândia	PVY <sup>O</sup>	P1
yo803-Finl	AJ245555	Jokioinen - Finlândia	PVY <sup>O</sup>	P1
yoViik-Finl	AJ245556	Viikki - Finlândia	PVY <sup>O</sup>	P1
yo-Ucr	AJ315740	Ucrânia	PVY <sup>O</sup>	P1
yoNB-Can	AJ315741	New Brunswick - Canada	PVY <sup>O</sup>	P1
yo-USA	AJ315742	U.S.A.	PVY <sup>O</sup>	P1
yoBC-Can	AJ315745	British Colambia - Canada	PVY <sup>O</sup>	P1
yo139-Can	U09509	Canada, Batata	PVY <sup>O</sup>	5'NTR+ P1
yoTh-Ingl	M37180	Inglaterra, Batata cv.King Edward	PVY <sup>O</sup>	5'NTR+ P1
Pvyyo-LW	**	Polônia, Batata cv. Lipinski Wczesny	PVY <sup>O</sup>	5'NTR+ P1
yo-Tu	**	Tunísia, Batata	PVY <sup>O</sup>	5'NTR+ P1
yN242-Fr	AF248499	França, batata, "Serotipo O"	PVY <sup>N</sup>	5'NTR + P1
ynWi-P	AF248500	Polônia, batata, "Serotipo O"	PVY <sup>N</sup>	5'NTR + P1
ynN266-NA	AF401600	Norte Americano	PVY <sup>N</sup>	5'NTR + P1
ynN394-NA	AF401601	Norte Americano	PVY <sup>N</sup>	5'NTR + P1
yn5Y1-NA	AF401605	Norte Americano, Fumo	PVY <sup>N</sup>	5'NTR + P1
ynN27-NA	AF401606	Norte Americano	PVY <sup>N</sup>	5'NTR + P1
yn NJg-NA	AF401607	Norte Americano	PVY <sup>N</sup>	5'NTR + P1
yn-RUS	AJ245557	Rússia	PVY <sup>N</sup>	P1
ynUK-RU	AJ245558	Reino Unido	PVY <sup>N</sup>	P1
yn-Din	AJ315738	Dinamarca	PVY <sup>N</sup>	P1
yn-Russo	AJ315746	Rússia	PVY <sup>N</sup>	P1
yn-Ing	AJ315747	Inglês, Reino Unido	PVY <sup>N</sup>	P1
pvyn-Fr	X12456	França	PVY <sup>N</sup>	5'NTR+ P1
yn605-Sw	X97895	Isolado Sulço 605	PVY <sup>N</sup>	5'NTR+ P1
pvyn-Wi	**	Polônia, cv. Wilga (Tordo et al., 1995)	PVY <sup>N</sup>	5'NTR+ P1
pvyn-NY	**	Polônia, Batata cv. Nysa (Tordo et al., 1995)	PVY <sup>N</sup>	5'NTR+ P1
ntn-SI 44	AF401602	Eslovênia	PVY <sup>NTN</sup>	5'NTR + P1
ntn-SI 50	AF401603	Eslovênia	PVY <sup>NTN</sup>	5'NTR + P1
ntn-SI 64	AF401604	Eslovênia	PVY <sup>NTN</sup>	5'NTR + P1
ntnTu619-NA	AF401608	Norte Americano	PVY <sup>NTN</sup>	5'NTR + P1
ntnTu660-NA	AF401609	Norte Americano	PVY <sup>NTN</sup>	5'NTR + P1
ntnTu648-EU	AF401610	"Tipo Europeu "	PVY <sup>NTN</sup>	5'NTR + P1
ntn-Slov	AJ315739	Eslovênia	PVY <sup>NTN</sup>	P1
ntn-Calif	AJ315744	Califórnia	PVY <sup>NTN</sup>	P1
ntnH-Hun	M95491	Hungria	PVY <sup>NTN</sup>	5'NTR+ P1
yntn-Lb	**	Líbano, Batata cv. Lola (Tordo et al., 1995)	PVY <sup>NTN</sup>	5'NTR
yc-Esc	AJ315743	Escocês, Reino Unido	PVY <sup>C</sup>	P1
yc-PVC	M38377	Isolado "PVC", Batata	PVY <sup>C</sup>	5'NTR+ P1
yMsNr	AF463399	"PVY-MN"	PVY	P1
ynNC78-NA	**	Sudeste U.S.A., Fumo (Tordo et al., 1995)	PVY-NN	5'NTR+ P1
yP21-Tu	**	Tunísia, Pimentão (Tordo et al., 1995)	PVY-0	5'NTR+ P1
yP2-Tu	**	Tunísia, Pimentão (Tordo et al., 1995)	PVY-0	5'NTR+ P1
I-136	**	Canadá, Batata (McDonald & Singh, 1996)	PVYN	5'NTR

TABELA 2 B. Denominação e caracterização de isolados obtidos no GenBank e mais dez não inseridos (\*\*), nas regiões referente aos últimos 23aa. C-terminal da Nib e/ou N-terminal da CP. UFLA, Lavras-MG, 2003...continua...

Isolados	Nº Acesso	Origem e hospedeira	Classe Biológica
yoSm-Índia	AF118153	Índia, <i>Solanum melongena</i>	PVY <sup>O</sup>
PVY-OB	AF255659	Distrito Federal - Brasil, Batata	PVY <sup>O</sup>
yO803-Sw	AJ223594	Isolado Suíço (Jakab et al., 1997)	PVY <sup>O</sup>
yo-v951204	AJ390292	Reino Unido, Batata	PVY <sup>O</sup>
yoNN-UK-O	AJ390297	Reino Unido, Batata	PVY <sup>O</sup>
yo-Índia	AY061994	Isolado Indiano (Ghosh et al., <i>ñ</i> /publicado)	PVY <sup>O</sup>
yo-Jap	D12539	Isolado do Japão, Batata	PVY <sup>O</sup>
yo36-Jap	S74810	Isolado do Japão, Batata cv. Danshaku-imo	PVY <sup>O</sup>
yo139-Can	U09509	Isolado do Canadá, Batata	PVY <sup>O</sup>
yo-Arg	X14136	Isolado da Argentina, Batata	PVY <sup>O</sup>
pvyo-US	X68222	'NC179', Potato US, Batata, U.S.A	PVY <sup>O</sup>
yoMM-USA	X68226	Isolado MsMr, infectando fumo, U.S.A.	PVY <sup>O</sup>
pvyo-LW	Z70239	Polônia cv. Lipinski Wczesny	PVY <sup>O</sup>
pvyo-Tu	**	Tunísia, Batata (Fakhfakh et al., 1995)	PVY <sup>O</sup>
pvyO-Jap	**	Japão, Batata (Ohshima et al., 1991).	PVY <sup>O</sup>
yoD-Austl	**	Austrália, Batata (Shukla et al., 1986)	PVY <sup>O</sup>
PVY-NBr	AF255660	Distrito Federal - Brasil, Batata	PVY <sup>N</sup>
yn-N854	AJ223592	Isolado Suíço N854 (Jakab et al., 1997)	PVY <sup>N</sup>
yN-RB-RU	AJ390285	Reino Unido, Batata	PVY <sup>N</sup>
yn53-49-Din	AJ390299	Dinamarca, Batata	PVY <sup>N</sup>
yn-v951175	AJ390304	Reino Unido, Batata	PVY <sup>N</sup>
yn-T-Jap	D12570	Japão, isolado T, Batata	PVY <sup>N</sup>
yn-T13-Jap	S74813	Isolado do Japão	PVY <sup>N</sup>
yN27-92-Can	U09508	New Brunswick – Canadá, Batata	PVY <sup>N</sup>
pvyN-Fr	X12456	Isolado da França, Batata	PVY <sup>N</sup>
yn-RUS	X54636	Isolado Russo, Batata	PVY <sup>N</sup>
yn605-Sw	X97895	Suíça, Batata cv. Bintje (1976)	PVY <sup>N</sup>
pvyN-Ny	Z70237	Polônia, Batata cv. Nysa (1974)	PVY <sup>N</sup>
pvyN-Wi	Z70238	Polônia, Batata cv. Wilga (1984)	PVY <sup>N</sup>
pvyN-Ntl	**	Holanda, Van der Vlugt et al. (1989)	PVY <sup>N</sup>
ynI-136	**	Canadá, Batata (MacDonald & Singh, 1996)	PVY <sup>N</sup>
pvy-Chl	X68221	'NC178', Chile, severa necrose em fumo	PVY
yGO16-Germ	**	Alemanha (Wefels et al., 1989).	PVY
yVN-Kor	U06789	Isolado Coreano, necrose em fumo	PVY-VN
ntnD6-Jap	AB025416	Aino- Japão, Batata cv. Dejima (1995)	PVY <sup>NTN</sup>
ntnUG70-Jap	AB042813	Fukue- Japão, Batata cv. Unzen (1998)	PVY <sup>NTN</sup>
ntmv951204-N	AJ390291	Reino unido, Batata	PVY <sup>NTN</sup>
ntn-Slov94	AJ390293	Eslovênia, Batata	PVY <sup>NTN</sup>
ntn53-29-Din	AJ390298	Dinamarca, Batata	PVY <sup>NTN</sup>
ntnS-RB-96	AJ390308	Reino Unido, Batata	PVY <sup>NTN</sup>
ntnH-Hun	M95491	Isolado da Hungria, Batata	PVY <sup>NTN</sup>
ntn-H	X54611	estirpe H, Hungria, Batata	PVY <sup>NTN</sup>
ntn-Austr	X79305	Austria, Batata	PVY <sup>NTN</sup>
pvy-EH	X68223	'NC189', "Europe-H", Fumo, Hungria	PVY
yc-27	AF012026	Isol. "27", Alemanha, trans. por afídeo, <i>ñ</i> / infec. Pimentão	PVY <sup>C2</sup>
yc-28	AF012027	Isol. "28", Alemanha, <i>ñ</i> /trans. por afídeo, infec. Pimentão	PVY <sup>C1</sup>

TABELA 2B, cont.

yC-CM-RU	AJ390302	Reino Unido, Batata	PVY <sup>c</sup>
ycO-Tom-Port	AJ390307	Portugal, Tomate	PVY <sup>c</sup>
yP21-82	AJ005639	Pimentão	PVY
ySi15-Itália	AJ303093	Sicília - Itália, Pimentão	PVY
yPN-82-Esp	AJ303096	Espanha, Pimentão	PVY
pvy-Pep	U10378	Isolado "nnp", Itália, Pimentão, necrose em fumo	PVY
pvy-P2	**	Tunísia, Pimentão (Fakhfakh et al., 1995)	PVY-O
pvy-P21	**	Tunísia, Pimentão (Fakhfakh et al., 1995)	PVY-O
pvy-NN	X68224	'NC78', Estirpe "NsNr", Fumo, sudeste U.S.A	PVY-NN
pvy-MN	X68225	'NC138', Estirpe "MsNr", Fumo sudeste U.S.A	PVY-MN
y18-Austl	**	Austrália, Fumo (Shukla et al., 1988).	PVY
y43-Austl	**	Austrália, Tomate (Shukla et al., 1988).	PVY
pvy-Chin	X54058	Isolado Chinês	PVY
PepMoVc	M96425	U.S.A.- Califórnia, Pimentão	PVY

TABELA 3 B. Porcentagem de identidade de nucleotídeos da região 5'NTR entre diferentes isolados de PVY, obtida através do múltiplo alinhamento utilizando o Clustal W. As menores identidades, entre os oitos isolados estudados, estão em negrito e as maiores, sublinhadas. UFLA, Lavras-MG, 2003.

Isolados	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36			
1:YN-UFLA	---	54	54	55	54	95	94	95	54	98	55	55	54	54	54	57	55	55	56	56	54	95	76	95	54	95	54	54	97	56	97	77	97	77	77	56			
2:YNBr		---	96	99	<u>100</u>	54	<u>53</u>	56	100	55	83	83	100	99	100	85	82	81	83	83	100	54	55	57	100	53	100	100	65	83	65	55	65	55	57	99			
3:YN404Sp			---	96	96	54	<u>53</u>	56	96	55	79	79	96	96	96	82	79	78	80	80	96	54	54	57	96	53	96	65	79	65	54	65	54	55	96				
4:YN21Sp				---	99	55	54	57	99	56	83	83	99	98	99	86	83	82	84	84	99	55	56	57	99	54	99	99	66	83	66	56	66	56	57	98			
5:YO-07					---	54	<u>53</u>	56	100	55	83	83	100	99	100	85	82	81	83	83	100	54	55	57	100	53	100	100	65	83	65	55	65	55	57	99			
6:YO229Sp						---	98	95	54	95	55	55	54	54	54	58	55	55	56	56	54	100	75	94	54	95	54	54	96	56	96	76	96	76	56	56			
7:YOATLMg							---	93	53	94	54	54	53	53	53	57	55	55	55	55	53	98	75	93	53	93	53	53	95	55	95	75	95	75	55	55			
8:YO-28Sp								---	56	95	53	<u>53</u>	<u>56</u>	<u>56</u>	<u>56</u>	<u>56</u>	54	54	55	55	56	95	75	96	56	95	56	56	97	55	97	75	97	75	57	57			
9:yn242-Fr									---	55	83	83	100	99	100	85	82	81	83	83	100	54	55	57	100	53	100	100	65	83	65	55	65	55	57	99			
10:ynWi-P										---	56	56	55	55	55	59	57	57	57	57	55	95	76	95	55	95	55	55	97	57	97	77	97	78	57	57			
11:ynN266NA											---	100	83	83	83	92	99	98	97	98	83	55	64	56	83	54	83	83	60	97	60	65	60	65	66	82	82		
12:ynN394NA												---	83	83	83	92	99	98	97	98	83	55	64	56	83	54	83	83	60	97	60	65	60	65	66	82	82		
13:ntnSI44													---	99	100	85	82	81	83	83	100	54	55	57	100	53	100	100	65	83	65	55	65	55	57	99	99		
14:ntnSI50														---	99	84	83	82	84	84	99	54	55	57	99	53	99	99	63	83	63	55	63	55	57	98	98		
15:ntnSI48															---	85	82	81	83	83	100	54	55	57	100	53	100	100	65	83	65	55	65	55	57	99	99		
16:yn5Yt-NA																---	92	92	92	85	58	67	56	85	57	85	85	58	92	58	67	58	67	69	84	84			
17:yn27-NA																	---	99	98	98	82	55	65	57	82	55	82	82	61	98	61	65	61	65	67	81	81		
18:ynNJg-NA																		---	97	98	81	55	65	57	81	55	81	81	61	97	61	65	61	65	67	81	81		
19:ntnTu619NA																			---	99	83	56	64	55	83	55	83	83	61	98	61	65	61	65	66	83	83		
20:ntnTu660NA																					---	83	56	65	55	83	55	83	83	61	99	61	65	61	65	67	83	83	
21:ntnTu648Eu																						---	54	55	57	100	53	100	100	65	83	65	55	65	55	57	99	99	
22:yo139-Can																							---	75	94	54	95	54	96	56	96	76	96	76	56	56	56	56	
23:yc-PVC																								---	74	55	77	55	55	76	65	76	93	76	93	91	55	55	
24:yoTh-IngI																									---	57	95	57	57	96	55	96	75	96	75	75	56	56	
25:ntnH-Hun																										---	53	100	100	65	83	65	55	65	55	57	99	99	
26:pvyn-Fr																											---	53	53	97	55	97	77	97	77	55	55	55	
27:yn605-Sw																													---	100	65	83	65	55	65	55	57	99	99
28:ynntn-Lb																														---	65	83	65	55	65	55	57	99	99
29:pvyn-Wi																														---	61	83	65	55	65	55	57	99	99
30:pvyn-NY																															---	61	65	61	65	67	82	82	
31:pvyo-Lw																															---	78	100	78	78	67	67	67	
32:yo-Tu																															---	78	100	98	55	55	55	55	
33:ynnNC78NA																																---	78	100	98	55	55	55	
34:pvyp21-Tu																																	---	78	78	67	67	67	
35:pvyp2-Tu																																		---	98	55	55	55	
36: I-136																																						---	

TABELA 4 B. Porcentagem de identidade de aminoácidos da região N-terminal da proteína P1 entre diferentes isolados de PVY, obtida através do alinhamento múltiplo utilizando o Clustal W. As menores identidades, entre os isolados estudados, estão em negrito e as maiores, sublinhadas. UFLA, Lavras-MG, 2003.

Isolados	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36		
1-YN-UFLA	--	68	68	67	68	91	92	94	69	98	66	68	67	67	66	67	70	96	68	95	93	93	77	89	67	93	83	95	67	96	66	95	68	95	95	79		
2-YNBr		--	96	96	<u>98</u>	68	69	67	97	68	86	98	97	89	86	97	64	68	96	67	70	70	71	67	90	69	67	70	95	67	96	69	88	69	69	63		
3-YN404Sp			--	95	97	68	69	67	94	68	86	97	96	88	86	96	63	68	95	67	70	70	71	67	90	69	67	70	94	67	95	69	88	69	69	63		
4-YN-21Sp				--	97	67	68	66	96	67	87	97	98	90	87	98	65	67	97	66	69	69	72	68	91	68	68	68	96	66	97	68	89	68	68	64		
5-YO-07					--	68	69	67	96	68	87	100	98	90	87	98	64	68	97	67	70	70	71	67	91	69	67	70	96	67	97	69	89	69	69	63		
6-YO229Sp						--	<u>98</u>	91	67	92	66	68	67	67	66	67	70	92	67	91	95	93	77	91	67	97	81	92	67	91	66	90	68	90	90	76		
7-YOATLMg							--	92	68	93	67	69	68	68	67	68	71	93	68	92	96	94	78	92	68	98	82	93	68	92	67	91	69	91	91	77		
8-YO-28Sp								--	68	95	65	67	66	65	66	65	66	71	93	67	96	91	90	76	88	66	93	84	94	66	95	67	92	67	92	80		
9-yn242-Fr									--	69	84	96	95	87	84	95	63	67	94	68	69	69	70	66	88	68	68	68	93	68	94	70	86	70	70	64		
10-ynWi-Pol										--	66	68	67	67	66	67	71	97	68	96	92	64	78	90	67	94	84	94	67	95	66	96	68	96	96	80		
11-ynN266-NA											--	87	88	92	97	88	65	68	87	65	66	66	70	66	95	67	67	68	86	67	87	67	97	67	67	65		
12-mtnSI 44												--	98	90	87	98	64	68	97	67	70	70	71	67	91	69	67	70	96	67	97	69	89	69	69	63		
13-mtnSI 64													--	91	88	100	65	67	98	66	69	69	72	68	92	68	68	69	97	66	98	68	90	68	68	64		
14-yn5Yt-NA														--	92	91	65	68	90	66	69	69	73	68	94	68	68	69	93	66	90	68	92	68	68	64		
15-mtnTu619-NA															--	88	65	68	87	65	66	66	70	66	95	67	67	68	86	67	87	67	97	67	67	65		
16-mtnTu648-EU																--	65	67	98	66	69	69	72	68	92	68	68	69	97	66	98	68	90	68	68	64		
17-yMsNr																	--	72	64	69	69	71	77	72	66	71	75	71	64	69	64	71	67	71	71	72		
18-ynUK-RU																		--	68	94	92	94	79	90	69	94	82	94	67	93	66	94	70	94	94	78		
19-yn-Din																			--	67	70	70	71	69	91	69	68	70	96	67	97	69	89	69	69	64		
20-yo-Ucr																				--	91	91	76	89	66	93	84	93	66	94	67	93	67	93	93	80		
21-yoNB-Can																					--	95	78	92	69	97	80	94	69	93	68	90	68	90	90	75		
22-yo-USA																						--	80	92	69	95	82	91	69	90	68	92	68	92	77			
23-yo-Esc																							--	78	73	78	87	77	72	76	71	77	72	77	77	84		
24-yoBC-Can																								--	68	93	81	89	68	88	67	88	68	88	88	76		
25-yn-Russ																									--	68	68	69	90	68	91	68	97	68	68	66		
26-yo139Can																										--	82	94	68	93	67	92	69	92	92	77		
27-yo-PVC																											--	81	68	82	69	82	69	82	82	91		
28-yoTh-IngI																												--	69	96	68	91	70	91	91	77		
29-mtnH-Hun																													--	66	96	68	88	68	68	64		
30-pvyn-Fr																														--	65	92	69	92	92	80		
31-yn605-Sw																															--	67	89	67	67	65		
32-pvynWi-P																																--	69	100	100	78		
33-pvynNY-P																																		--	68	69	67	
34-pvynLW-P																																				--	100	78
35-yo-Tu																																					--	78
36-yP21-Tu																																						--

TABELA 5 B. Porcentagem de identidade de aminoácidos da região dos últimos 23aa. C-terminal N1b e os primeiros 158aa. da N-terminal CP (Diagonal superior) e somente dos últimos 23aa. C-terminal N1b (Diagonal inferior), entre diferentes isolados de PVY, obtida através do alinhamento múltiplo utilizando o Clustal W. As menores identidades, entre os oitos isolados, estão em negrito e as maiores, sublinhadas. UFPA, Lavras-MG, 2003.

Isolados	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34			
1: YN-UFPA	---	95	93	96	94	93	94	97	94	95	89	90	95	90	92	95	89	95	90	92	95	95	90	90	90	90	90	95	92	95	92	95	93	91	90	90	89
2: YNBr-MG	91	---	97	<u>28</u>	<u>28</u>	96	<u>28</u>	97	95	96	88	89	97	89	91	97	88	93	90	95	93	94	89	88	91	89	96	91	96	94	90	90	89	88	87	88	
3: YNBr2-MG	91	<u>100</u>	---	96	97	94	97	95	93	94	87	95	97	90	96	87	91	88	93	92	92	92	87	86	90	87	94	89	95	92	88	88	87	87	88		
4: YN404Sp	91	<u>100</u>	<u>100</u>	---	<u>28</u>	97	<u>28</u>	97	96	96	89	90	97	90	92	98	89	93	90	95	94	95	90	91	90	91	92	96	95	91	90	90	89	89			
5: YO-07MG	91	<u>100</u>	<u>100</u>	<u>100</u>	---	96	<u>28</u>	97	95	96	88	89	97	89	91	88	92	90	95	92	94	89	88	91	89	96	91	96	94	90	90	89	88	87			
6: YO229Sp	91	<u>100</u>	<u>100</u>	<u>100</u>	<u>100</u>	---	96	95	95	95	87	88	95	88	90	96	87	91	88	93	92	94	88	88	89	88	98	91	95	93	90	88	88	87			
7: YOATLMg	91	<u>100</u>	<u>100</u>	<u>100</u>	<u>100</u>	<u>100</u>	---	97	95	96	88	89	97	89	91	97	88	92	90	95	92	94	89	88	91	89	96	91	96	94	90	89	88	87			
8: YO-28Sp	95	95	95	95	95	95	95	---	97	97	90	97	91	93	98	90	95	91	95	95	96	91	90	92	91	96	92	97	96	92	91	91	90				
9: yo5m-India	91	91	91	91	91	91	91	95	---	97	89	90	96	90	92	96	89	92	90	93	92	95	90	88	91	90	96	91	96	91	90	90	89				
10: PVY-OBf	95	95	95	95	95	95	95	<u>100</u>	95	---	91	91	97	91	92	97	91	92	94	93	97	91	91	91	91	91	96	92	97	96	91	91	91	90			
11: PVY-NBr	91	86	86	86	86	86	86	91	86	91	---	98	89	98	96	90	97	87	90	88	88	98	97	92	98	88	91	89	93	97	97	97					
12: yn-NR54	91	86	86	86	86	86	86	91	86	91	<u>100</u>	---	90	100	96	90	98	88	99	91	88	89	98	98	92	98	89	88	91	90	94	98	98	97			
13: yo803-Sw	86	95	95	95	95	95	95	91	86	91	82	82	---	90	92	97	89	92	90	94	93	96	90	88	91	90	96	91	96	95	91	90	90	89			
14: Yn-RB-RU	91	86	86	86	86	86	86	91	86	91	100	100	82	---	96	90	98	88	99	91	88	89	98	98	92	98	89	88	91	90	94	98	98	97			
15: nmv951204	86	82	82	82	82	82	82	86	82	86	95	78	95	---	92	96	90	97	91	90	91	90	91	96	96	95	96	91	90	93	92	97	96	96			
16: yov951204	95	95	95	95	95	95	95	100	95	100	91	91	91	86	---	90	93	91	96	93	95	90	89	91	90	96	92	96	95	91	91	90	90				
17: ntn-Slov94	86	82	82	82	82	82	82	86	82	86	95	95	78	95	100	86	---	87	98	90	88	88	97	98	91	97	88	87	90	93	97	97	96				
18: ynN-UK-O	95	91	91	91	91	91	91	95	91	95	95	95	86	95	91	95	91	---	88	92	99	91	88	88	88	92	90	93	91	88	88	87					
19: nms3-29Din	91	86	86	86	86	86	86	91	86	91	100	100	82	100	95	91	95	95	---	91	89	90	99	98	93	99	90	89	92	90	95	98	98				
20: Ye-CM-RU	95	95	95	95	95	95	95	100	95	100	91	91	91	86	100	86	95	91	95	---	93	92	91	90	91	91	91	93	89	94	92	89	91	90			
21: O-Tom-Port	95	91	91	91	91	91	91	95	91	95	95	95	86	95	91	95	100	95	91	100	95	---	89	88	88	88	93	91	93	92	89	89	88				
22: yo-Jap	95	95	95	95	95	95	95	100	95	100	91	91	91	91	86	100	86	95	91	100	95	---	89	88	88	88	93	91	93	92	89	89	88				
23: yn-T-jap	91	86	86	86	86	86	86	91	86	91	100	100	82	100	95	91	95	95	100	91	95	91	95	91	95	91	95	91	90	90	89	88					
24: nmtH-Hun	86	82	82	82	82	82	82	86	82	86	95	78	95	100	86	100	91	95	86	91	86	95	---	91	97	89	88	90	88	93	97	97	96				
25: yVN-Kor	91	82	82	82	82	82	82	86	82	86	82	82	78	82	78	86	78	86	82	86	86	82	78	---	92	90	88	94	91	92	93	92	92				
26yN27-92Can	91	86	86	86	86	86	86	91	86	91	100	100	82	100	95	91	95	100	91	95	91	100	95	91	100	95	82	86	---	89	88	91	90	94	98	97	
27: yo139-Can	78	73	73	73	73	73	73	78	73	78	73	78	73	78	78	78	78	82	82	78	82	78	82	78	73	82	73	---	92	90	90	88	88				
28: y-nmp	100	91	91	91	91	91	91	95	91	95	91	86	91	86	95	86	95	91	95	95	91	95	91	86	91	91	91	78	---	95	92	92	91	91			
29: pvyN-Fr	95	95	95	95	95	95	95	100	95	100	91	91	91	86	100	86	95	91	100	95	100	91	86	91	86	91	95	78	95	---	91	90	89	89			
30: pvy-Chin	86	82	82	82	82	82	82	86	82	86	95	78	95	95	86	95	91	95	86	91	86	95	86	95	86	95	78	85	---	95	93	93					
31: yn-RUS	91	86	86	86	86	86	86	91	86	91	100	100	82	100	95	91	95	95	100	91	95	91	100	95	82	100	86	82	91	91	95	---	97	98			
32: yn605-Sw	91	86	86	86	86	86	86	91	86	91	100	100	82	100	95	91	95	95	100	91	95	91	100	95	82	100	86	82	91	91	95	---	97	98			
33: pvyN-NL	91	86	86	86	86	86	86	91	86	91	100	100	82	100	95	91	95	95	100	91	95	91	100	95	82	100	86	82	91	91	95	---	97	98			
34: yGO16Germ	86	82	82	82	82	82	82	86	82	86	95	78	95	91	86	91	86	91	91	95	86	91	86	91	82	95	82	86	86	91	95	---	95	95			

