

**CARACTERIZAÇÃO DE ISOLADOS DE
Potato virus S (PVS) NO BRASIL E SEU
EFEITO NA PRODUÇÃO DE BATATA**

SILVIA REGINA RODRIGUES DE PAULA RIBEIRO

2007

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

Ribeiro, Silvia Regina Rodrigues de Paula.

Caracterização de isolados de *Potato virus S* (PVS) no Brasil e seu efeito na produção de batata. / Silvia Regina Rodrigues de Paula Ribeiro. - Lavras : UFLA, 2007.

108p. : il.

Orientadora: Antonia dos Reis Figueira.

Tese (Doutorado) – UFLA.

Bibliografia.

1. *Potato virus S*. 2. Batata. 3. Molecular. 4. Produção de batata. 5. Viroses. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 635.2198

SILVIA REGINA RODRIGUES DE PAULA RIBEIRO

**CARACTERIZAÇÃO DE ISOLADOS DE *Potato virus S* (PVS) NO
BRASIL E SEU EFEITO NA PRODUÇÃO DE BATATA**

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

Aprovada em 31 de julho de 2007.

Prof. Dr. César Augusto Brasil Pereira Pinto	UFLA
Prof. Dr. Ricardo Magela de Souza	UFLA
Prof. Dr. José da Cruz Machado	UFLA
Dr. Joaquim Gonçalves de Pádua	EPAMIG

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

LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL

A Deus, ao Santo Expedito e a todos os meus Santos de devoção,
por me darem muita saúde e força
e ainda por me ajudarem em tudo que peço,
OFEREÇO.

As pessoas mais importantes da minha vida eu **DEDICO** este trabalho e **AGRADEÇO**, do fundo do meu coração, toda ajuda, amor, força, compreensão, paciência e companheirismo: **PEDRO**, meu filho querido; minha mãe, Ilza; Telma, minha secretária; meus irmãos, Mônica, Ricardo e Vanessa; meu pai, Geraldo; Alexandre, meu marido; minha cunhada Cíntia e Tio Alfredo.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Lavras, pela oportunidade de realizar o Doutorado.

À Capes, pela concessão da bolsa de estudos.

A minha querida orientadora, Antonia, pela orientação, paciência, pelo exemplo de profissionalismo e, principalmente, pela amizade e companheirismo. MUITO OBRIGADA.

Aos professores do Departamento de Fitopatologia, pelos conhecimentos transmitidos e, em especial, aos professores Ricardo Magela, Mário Lúcio e Eduardo Alves, por toda a ajuda.

A todos os funcionários do Departamento de Fitopatologia, em especial Renata (secretária), Ana Maria, Ruth e a Rosângela, pela ajuda no decorrer do curso.

Aos meus amigos do curso: Ellen, Hermínio, Juliano, Flávio, Eduardo, Dan Dan, Ângelo, Hebe e Luciana, que muito me ajudaram nos grupos de estudo.

As minhas grandes amigas ANTONETES: Sú, Pri e Alessandra, pelo companheirismo, pela amizade, ensinamentos e, principalmente, pela paciência.

Aos meus amigos da Virologia: João, Thaís, Jaciara, Samuca, Cleiton, Câmara, Rejane, Charles, Lú e, em especial, ao Carzinho, por me auxiliar com sua valiosa experiência e a minha grande amiga Val, por toda a sua ajuda. MUITO OBRIGADA A TODOS.

As minhas fiéis amigas que, mesmo longe, me deram todo apoio, Gislayne, Carol, Tia Zânia, Bilux, Cris, Taninha, Narinha, Rose e a todos os meus amigos.

A todos os meus familiares e amigos que, direta ou indiretamente, contribuíram para realização deste trabalho.

DO FUNDO DO MEU CORAÇÃO EU AGRADEÇO A TODOS, POIS SEM A AJUDA DE CADA UM DE VOCÊS EU NÃO TERIA CONSEGUIDO.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO	i
ABSTRACT.....	iii
CAPÍTULO 1	
1 INTRODUÇÃO GERAL.....	01
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	03
2.1 A batata como alimento e seu valor nutricional.....	03
2.2 A produção de batata no Brasil.....	05
2.3 Efeito das enfermidades viróticas sobre a batata-semente no Brasil.....	05
2.4 Estirpes do vírus S.....	07
2.5 Transmissão de isolados do PVS.....	09
2.6. Características biológicas, sorológicas e moleculares do PVS ^A e PVS ^O	11
2.6.1 Sintomatologia e gama de hospedeiras.....	11
2.6.2 Caracterização sorológica.....	12
2.6.3 Aspectos moleculares das duas estirpes do PVS.....	12
2.7 Perdas causadas pelo PVS.....	16
3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	19
CAPÍTULO 02 – Caracterização Biológica e Molecular de isolados de <i>Potato virus S (PVS)</i> no Brasil.....	26
RESUMO.....	27
ABSTRACT.....	29
1 INTRODUÇÃO.....	31
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	33

2.1 Local.....	33
2.2 Origem dos isolados de PVS.....	33
2.3 Caracterização Biológica.....	34
2.3.1 Sintomatologia e gama de hospedeiras.....	34
2.3.2 Teste de transmissão por vetor.....	35
2.4 Teste sorológico.....	36
2.5 Caracterização molecular.....	37
2.5.1 Extração do RNA total.....	37
2.5.2 Transcrição Reversa (RT).....	38
2.5.3 Reação da polimerase em cadeia (PCR).....	39
2.5.4 Sequenciamento e análise das seqüências.....	39
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	41
3.1 Propriedades biológicas dos isolados de PVS.....	41
3.2 Transmissão do isolado BB-AND pelo vetor.....	44
3.3 Caracterização molecular dos isolados de PVS.....	45
4 CONCLUSÕES.....	55
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	56

CAPÍTULO 3 – Efeito do *Potato virus S* (PVS) na produção de batata em infecções simples e mistas..... 60

RESUMO..... 61

ABSTRACT..... 62

1 INTRODUÇÃO..... 63

2 MATERIAL E MÉTODOS..... 65

2.1 Local..... 65

2.2 Obtenção dos inóculos virais..... 65

2.3 Teste sorológico DAS-ELISA..... 66

2.4 Produção de tubérculos com infecções simples e mistas 66

2.5 Avaliação dos vírus na produção de batata, cv. Ágata, em condições de campo.....	68
2.6 Análises Estatísticas.....	69
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	71
3.1 Sintomas provocados pelo PVS em infecções simples e mistas em casa de vegetação.....	71
3.2 Efeito do PVS em infecções simples e mistas na produção de batata em condições de campo.....	76
4 CONCLUSÕES.....	81
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	82
ANEXOS.....	83

ANEXOS

ANEXO A

- TABELA 1A Resumo da Análise de Variância da Produção Comercial (kg/hectares), obtida pela avaliação dos tratamentos com 50% e 15% de incidência inicial de viroses, respectivamente. Lavras, 2007.....84
- TABELA 2A Resumo da Análise de Variância do número de tubérculos graúdos por planta, obtida pela avaliação dos tratamentos com 50% e 15% de incidência inicial de viroses, respectivamente. Lavras, 2007.....84
- TABELA 3A Resumo da Análise de Variância do número de tubérculos médios por planta, obtida pela avaliação dos tratamentos com 50% e 15% de incidência inicial de viroses, respectivamente. Lavras, 2007.....85
- FIGURA 3A Alinhamento das seqüências de nucleotídeos do gene da capa protéica dos dez isolados estudados, dezesseis isolados disponíveis no GenBank e um isolado brasileiro.....86
- FIGURA 4A Alinhamento das seqüências de aminoácidos do gene da capa protéica dos dez isolados estudados, dezesseis isolados disponíveis no GenBank e um isolado brasileiro.....102

RESUMO

RIBEIRO, Silvia Regina Rodrigues de Paula. **Caracterização de isolados de *Potato virus S (PVS)* no Brasil e seu efeito na produção de batata.** 2007. p.108. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.*

O *Potato virus S (PVS)* apesar de ser um dos vírus mais comuns da cultura da batata, não tem sido muito estudado, devido aos sintomas quase imperceptíveis em plantas de batata e aos relatos não significativos de perdas na produção, devido à presença desse vírus na lavoura. O PVS possui duas estirpes diferenciadas pela transmissão: a estirpe comum (PVS^O) transmitida pelas sementes e a estirpe andina (PVS^A) transmitida pelo vetor *Myzus persicae*, de modo não-persistente ou estiletar. Para estudar as propriedades biológicas e moleculares dos isolados de PVS, que ocorrem no Brasil, dez isolados foram coletados, sendo oito no Estado de Minas Gerais, um do Estado de São Paulo e um do Estado do Rio Grande do Sul. Esses isolados foram inoculados em dez espécies de plantas, sendo que nove deles tiveram um fragmento genômico de 908 pb, contendo a região da capa protéica (CP), amplificados com um par de primers desenhado para o PVS^O, e um deles somente foi amplificado com o primer específico para o PVS^A, tendo sido obtido um fragmento de 949pb, também contendo a região CP. Esses fragmentos foram seqüenciados e analisados. Para verificar o efeito de infecções simples e mistas do PVS, com outros vírus da batata, foram produzidos tubérculos infectados nas seguintes combinações: PVS, PVX e PVY; PVS + PVX, PVS + PVY, PVX + PVY e PVS + PVX + PVY (50% de incidência inicial); PLRV, PVS + PLRV, PVS + PLRV + PVX, PVS + PLRV + PVY; PVS + PLRV + PVX + PVY (15 % de incidência inicial). Esses tubérculos foram plantados no campo, sendo o experimento em blocos casualizados, com 40 plantas por parcela e 4 repetições. Foi avaliada a produção comercial, calculando-se a perda de produção em relação à parcela controle sem vírus, e os tubérculos foram classificados quanto o tamanho. Dentre as plantas inoculadas, as plantas de tomate (*Lycopersicon esculentum*) foram suscetíveis apenas aos isolados SJ-CHI e SJ-CAL, respondendo com anéis arroxeados na face inferior da folha. Todos eles causaram lesões locais cloróticas em plantas de *Chenopodium amaranticolor* e nove isolados causaram o mesmo tipo de lesões em *Chenopodium quinoa*. Um deles, o denominado de BB-AND, causou infecção sistêmica em *C. quinoa* e foi transmitido pelo vetor *Myzus persicae* para 11% das plantas inoculadas.

* Orientadora: Antonia dos Reis Figueira – UFLA

* Co-Orientador: César Augusto Brasil Pereira Pinto – UFLA

A análise filogenética mostrou que nove isolados apresentaram maior identidade de nucleotídeos e aminoácidos com os isolados comuns de PVS (PVS^O), enquanto que o BB-AND apresentou maior identidade com os isolados Andinos (PVS^A). Nas árvores filogenéticas baseadas na seqüência de nucleotídeos e de aminoácidos, os 9 isolados também se agruparam com os isolados comuns e o BB-AND com os isolados Andinos. Apesar da sua proximidade com os isolados Andinos disponíveis no GenBank, provenientes da Inglaterra, República Tcheca e Canadá, o BB-AND apresentou uma distância filogenética significativa desses isolados, indicando que provavelmente ele possui uma outra origem geográfica. Nos experimentos de campo, nas parcelas com 50% de incidência inicial, a menor perda foi de 15,01%, causada por infecção simples com o PVX e a maior foi de 37,03%, causada pela infecção com o PVS+PVX+PVY. Nas parcelas com incidência inicial de 15%, a menor perda foi de 10,99%, causada por infecção simples com o PLRV e a maior foi de 40,92%, causada pela infecção com os quatro vírus juntos. Ficou evidente que, quando o PVS se associou a outros vírus, as perdas e os sintomas foram mais intensos do que os induzidos por cada vírus separadamente.

ABSTRACT

RIBEIRO, Silvia Regina Rodrigues de Paula. **Characterization of the *Potato virus S (PVS)* strains in Brazil and effect on potato tuber yield.** 2007. 108p. Thesis (Doctorate in Phytopathology) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.*

Even being one of the most common viruses on potato field, the *Potato virus S* (PVS) has not been studied so far, due to the almost imperceptible symptoms in potato plants and also because the yield losses induced by this virus are not very high. There are two PVS strains that are differentiated by their transmissibility: the common strain (PVS^O) that is only transmitted by the seeds and the Andean strain (PVS^A) that can be transmitted by the vector *Myzus persicae* in a non persistent way. To study the biological and molecular properties of the Brazilian PVS isolates, ten isolates of PVS were collected: eight in Minas Gerais State, one in São Paulo State and one in Rio Grande do Sul State. Those isolates were inoculated in ten species of plants, and nine of them had a genomic fragment of 908 bp, containing the coat protein region (CP), amplified with a primers drawn for PVS^O. However, the one named BB-AND was only amplified with the specific primer for PVS^A, generating a fragment of 949bp, containing the CP region. Those fragments were sequenced and analyzed. To verify the effect of simple and mixed infections of PVS, with other potato viruses, infected tubers were produced with the following combinations: PVS, PVX AND PVY; PVS + PVX, PVS + PVY, PVX + PVY and PVS + PVX + PVY (50% of initial incidence); PLRV, PVS + PLRV, PVS + PLRV + PVX, PVS + PLRV + PVY; PVS + PLRV + PVX + PVY (15% of initial incidence). Those tubers were planted in the field, in experiment with randomized plots, using 40 plants per plot and 4 replications. The plant yield was evaluated and the yield losses, in relation to the control plot without virus, were determined. Among the inoculated plants, the tomato plants (*Lycopersicon esculentum*) were susceptible only to virus isolate named SJ-CHI and SJ-CAL, showing purple rings in the inferior face of the leaf. All of them caused chlorotic local lesions in plants of *Chenopodium amaranticolor* and nine isolates caused the same type of lesions in *Chenopodium quinoa*. The BB-AND isolate induced systemic infection in *C. quinoa* and was transmitted by the vector *Myzus persicae* to 11% of the inoculated plants. The phylogenetic analysis showed that nine isolates presented larger nucleotide and amino acids identities with the common isolates of

*Guidance Committee: Antônia dos Reis Figueira – UFLA (Adviser)
César Augusto Brasil Pereira Pinto – UFLA

PVS (PVS^O), while BB-AND presented larger identity with the Andean isolates (PVS^A). In the phylogenetic trees based on the nucleotide and amino acids sequence, the 9 isolates also grouped with the common isolates and BB-AND grouped with the Andean isolates. In spite of its proximity with the Andean isolates available in GenBank, that are from England, Czech Republic and Canada, BB-AND presented a phylogenetic distance from them, indicating that it should probably have another geographical origin. In the field experiments the smallest yield loss, in the plots with 50% of initial incidence, was of 15.01%, caused by simple infection with PVX, and the largest was of 37.03%, caused by the infection with PVS+PVX+PVY. In the plots with initial incidence of 15%, the smallest loss was 10.99%, caused by simple infection with PLRV, and the largest was of 40.92%, caused by the infection with the four viruses together. It was evident that when PVS is associated with the other viruses the losses and the symptoms were more intense than the ones induced separately by each virus.

CAPÍTULO 1

CARACTERIZAÇÃO DE ISOLADOS DE *Potato virus S* (PVS) NO BRASIL E SEU EFEITO NA PRODUÇÃO DA BATATA

1 INTRODUÇÃO GERAL

A batata (*Solanum tuberosum* L.) possui componentes que tornam seu consumo vantajoso do ponto de vista nutricional. Ela é considerada boa fonte de vitaminas, principalmente ácido ascórbico (vitamina C) e bastante rica em potássio (Pereira, 1987), nutriente que auxilia na prevenção de problemas vasculares. Essa hortaliça tem feito parte da dieta diária da população brasileira e, por isso, tem sido cultivada na maioria dos estados brasileiros, durante três safras distintas, com um montante de produção de cerca de 3 milhões de toneladas por ano (Agrianual, 2007).

A qualidade da batata-semente é um fator de suma importância para o rendimento da cultura, pois se trata de uma planta propagada vegetativamente por meio de tubérculos que, por sua vez, são facilmente afetados por patógenos (Hooker, 1981). Dentre os patógenos, os fitovírus estão entre os mais importantes, pois podem causar rápida degenerescência dos tubérculos, após várias multiplicações em campo. Até há pouco tempo, o vírus do enrolamento da folha da batata (*Potato leafroll virus* ou PLRV) era o responsável pelas maiores perdas na produção e o único responsável pela condenação das sementes de batata produzidas em território nacional (Figueira et al., 1985). Com a constante importação de batata-semente de países europeus, foram introduzidas no país estirpes do vírus Y (*Potato virus Y* ou PVY), mudando completamente o quadro da epidemiologia dos vírus de batata no Brasil (Figueira, 2002).

Recentemente, ocorreu a abertura da importação de batata-semente de países da América Latina, o que tem contribuído para que vírus que antes não eram considerados de grande importância, como o *Potato virus X* ou PVX e o *Potato virus S* ou PVS, tenham começado a surgir nas lavouras batateiras. Nos últimos anos, a incidência do vírus X e do vírus S aumentou a ponto de causar a condenação de lotes de sementes (Geraldino, 2006).

O vírus S da batata merece cuidados especiais por parte da legislação brasileira, pois infecções latentes em plantas de batata podem passar despercebidos no campo. Além disso, outro agravante é que o PVS possui duas estirpes, sendo que uma delas, denominada de Andina (PVS^A), pode ser transmitida pelo vetor *Myzus persicae*. Isso representa mais um risco para a produção de batata nacional, visto que o clima tropical brasileiro favorece a população do vetor ao longo do ano. Trabalhos com esse vírus são escassos no Brasil, portanto, não se têm informações sobre quais isolados do PVS aqui ocorrem, havendo o risco da presença da estirpe Andina, o que torna importantes a detecção e a diferenciação dos isolados presentes no território nacional.

Apesar das perdas na produção causadas pelo PVS não serem tão significativas quanto comparadas com outros vírus, elas se encontram em torno de 10% a 20% (Figueira, 1999). Mesmo sendo valores baixos, existe ainda o risco de infecções mistas do PVS com outros vírus importantes da cultura batata, o que pode acarretar perdas de grande magnitude (Wright, 1970; Manzer et al., 1978; Marton et al., 1993; German, 2001). A presença do PVS associado a outros vírus pode intensificar os sintomas causados pelos outros vírus. Segundo Figueira et al. (1985) e Geraldino et al. (2005), plantas infectadas com PVY conjuntamente com PVS apresentam sintomas de mosaico necrótico mais severo.

Para investigar que tipo de estirpe de PVS ocorre no Brasil, nesse trabalho foram coletados dez isolados desse vírus, em diversas regiões produtoras de batata e estes foram submetidos à caracterização biológica e molecular para detectar o grupo de estirpe a que eles pertencem. Foi também estudada a influência do PVS^O, sozinho e em combinações com o PVY, PVX e PLRV, na produção de tubérculos da cv. Ágata.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 A batata como alimento e seu valor nutricional

Segundo Talburt et al. (1975), entre os alimentos básicos da dieta diária, a batata é um dos mais nutritivos para o homem. Essa hortaliça possui alto índice de valor biológico, perdendo apenas para o ovo e para o leite e saindo à frente do trigo, arroz, feijão e milho. Em relação ao teor de proteínas e calorias disponíveis, a batata encontra-se em terceiro lugar, perdendo apenas para o feijão e para o trigo. A batata pode render cerca de 300kg de proteína por hectare, enquanto o trigo rende 200kg e o arroz, 168kg, o que a torna uma ótima opção alimentar para povos de países subdesenvolvidos ou em desenvolvimento.

Além disso, segundo dados da FAO, cerca de 70% do teor protéico da batata é constituído por tuberina, que contém todos os aminoácidos essenciais em níveis adequados, com exceção da metionina que, por sua vez, pode ser perfeitamente suprida por meio da combinação da batata com outros alimentos.

A batata é também uma fonte de vitaminas para a nutrição humana, principalmente ácido ascórbico (vitamina C) e vitaminas do complexo B (Tabela 1) (Pereira, 1987). Quanto aos minerais, apesar da variação nos teores devido a variedade, tratos culturais, clima, local de plantio, maturação e armazenamento, a batata é bastante rica em potássio, nutriente que torna as artérias humanas mais elásticas e, portanto, auxilia na prevenção de problemas vasculares, além de prevenir câimbras.

TABELA 1. Teores aproximados das principais vitaminas (tubérculos frescos) e dos principais minerais (peso seco) em batata (Talbur et al., 1975).

Componentes	mg/100g
Retinol	3,6–7,1
Ácido ascórbico	22,6–36,1
Tiamina, B ₁	60,0–99,3
Riboflavina, B ₂	31,1–78,0
Niacina	1180,0–2133,3
Piridoxina, B ₆	123,3–241,3
Ácido fólico	9,1–21,7
Fósforo	43–605
Cálcio	10-120
Magnésio	46–216
Sódio	0–332
Potássio	1394-2825
Ferro	3–18,5
Enxofre	43-423
Cloro	45–805
Zinco	1,7–2,2
Cobre	0,6–2,8
Silício	5,1–17,3
Manganês	0,18–8,5
Alumínio	0,2–3,54

2.2 A produção de batata no Brasil

A produção de batata no Brasil é de, aproximadamente, 3 milhões de toneladas/ano e como o país possui grande área disponível para plantio, a área plantada gira em torno de 130 a 177 mil hectares/ano. Dentre os principais estados produtores, Minas Gerais está em primeiro lugar há vários anos e produz 981.903 toneladas, seguido pelos estados de São Paulo, com 726.960 toneladas; Paraná, com 567.920 toneladas; Rio Grande do Sul, com 335.209 toneladas; Goiás, com 207.800 toneladas e Bahia, com 178.500 toneladas (Agrianual, 2007).

As condições climáticas brasileiras favorecem o cultivo da batata até três vezes por ano em três safras distintas (Vechi & Hirano, 1984). A safra das águas ocorre no período de agosto a dezembro e o seu rendimento médio é de, aproximadamente, 24.327kg/ha. A safra da seca ocorre no período de fevereiro a abril e o rendimento médio gira em torno de 22.174kg/ha. Finalmente, na safra de inverno, o plantio é feito no período de maio a julho e o rendimento médio é 28.742kg/ha (IBGE, 2007).

Considerando essas estatísticas, a produtividade média brasileira é considerada muito baixa e apresenta forte instabilidade, principalmente pelo fato da batata ser propagada vegetativamente, aliado ao clima tropical, que favorece a ocorrência de doenças e pragas o ano todo.

2.3 Efeito das enfermidades viróticas sobre a batata-semente no Brasil

O modo de multiplicação comercial empregado na cultura da batata, ou seja, pelo uso de tubérculos-sementes, facilita a instalação de enfermidades fúngicas, bacterianas e, principalmente, de natureza virótica. As viroses podem ser veiculadas por meio desses tubérculos, o que representa um risco em potencial, pois, em alguns casos, uma incidência mínima de vírus no campo pode ser suficiente para causar infecção generalizada (Cupertino & Costa, 1970).

Como consequência da utilização dos mesmos em plantios sucessivos ocorre o acúmulo de vírus nos tubérculos produzidos o que, com o passar do tempo, conduz à degenerescência, chegando, algumas vezes, a inviabilizar a cultura.

Os vírus mais freqüentemente relacionados com a degenerescência de tubérculos-semente no Brasil são o vírus do enrolamento das folhas da batata (*Potato leafroll virus* ou PLRV), o vírus Y da batata (*Potato virus Y* ou PVY), o vírus S da batata (*Potato virus S* ou PVS) e o vírus X da batata (*Potato virus X* ou PVX) (Pinto, 2003).

Segundo Mizubuti (1981), a maior ou a menor queda na produtividade, devido à ocorrência de viroses, dependem da cultivar, da estirpe do vírus e das condições edafoclimáticas da área de cultivo, porém, a redução pode chegar até 80% pela ação do PLRV; 50% pela ação do PVY, 10% a 20% para o PVS e 10% para o PVX (Figueira, 1999).

O vírus S da batata, é um dos vírus mais comuns na cultura (Slack, 1981). No Brasil, em todos os estados produtores, há relatos de sua existência nas lavouras (Cupertino et al., 1970; Figueira et al., 1985; Daniels, 1995; Figueira, 1995; Hirano, 1995; Souza-Dias, 1995). A presença única do vírus S na planta reduz a produção, em média, de 10% a 20% (Figueira, 1999). Além disso, pode ocorrer queda maior na produção quando o PVS se encontra associado a outros vírus de batata em infecções mistas (Wright, 1970; Manzer et al., 1978; Figueira et al., 1985; Marton et al., 1993; German, 2001; Geraldino et al., 2005).

O PVS, até há pouco tempo, não era considerado de grande importância, devido à porcentagem baixa de perdas na produção e aos sintomas latentes causados em plantas de batata. Entretanto, a importação de batata-semente, por parte dos grandes produtores, oriunda de países onde a ocorrência desse vírus é geralmente alta, tem colocado em risco as lavouras do país. Esse fato foi

relatado por Souza-Dias et al. (2001) que encontraram índices de 80% desse vírus em São Paulo. Em Minas Gerais, Figueira et al. (2004) detectaram índices de até 90% de PVS em batata-semente importada para pesquisa e, recentemente, em levantamento efetuado por Geraldino (2006) em lotes de batata que chegaram ao Centro de Indexação de MG, nos últimos 11 anos, constatou-se que, até os anos 1990, somente os vírus PLRV e PVY eram responsáveis pela condenação de lotes. Contudo, nos últimos anos, a incidência de PVX e PVS tem aumentado, a ponto de causar a condenação de lotes de sementes.

Além do risco de aumentar a incidência de viroses já existentes no Brasil, a batata-semente importada pode, ainda, introduzir outras estirpes dos vírus comumente aqui encontrados ou, até mesmo, novas viroses ainda não relatadas no país. Exemplo desse fato seria a introdução da estirpe Andina do PVS (PVS^A) nas lavouras brasileiras, pois, sendo essa estirpe transmitida por vetor, tornaria seu controle mais complicado, onerando ainda mais os custos de produção.

De acordo com a Instrução Normativa nº14, do Ministério da Agricultura, de 7 de junho de 2005, os índices permitidos para o PVS são: semente básica, 2%; certificada 1, 3% e certificada 2, 5%. Contudo, mesmo com os limites de tolerância estabelecidos, tem sido constatada a entrada no país de sementes com incidências maiores que as permitidas pela legislação (Souza Dias et al., 2001; Figueira et al., 2004; Geraldino, 2006). Isso se deve à falta de fiscalização adequada do material importado e à deficiência do programa de certificação nacional.

2.4 Estirpes do vírus S

O PVS possui duas estirpes diferenciadas pelos sintomas induzidos em plantas de *Chenopodium quinoa* e pelo seu modo de transmissão. A maioria dos isolados de PVS que ocorrem no mundo causa lesões cloróticas locais em

plantas *Chenopodium quinoa* e não possui vetor na natureza, de modo que são transmitidas apenas mecanicamente e têm sido denominados de PVS^O ou PVS comum. Entretanto, uma outra estirpe, denominada de estirpe Andina (PVS^A), já foi relatada e é capaz de ser transmitida pelo vetor *Myzus persicae* e causar infecção sistêmica em *C. quinoa*.

O primeiro relato de ocorrência do PVS^O foi feito na Holanda, no ano de 1951, por De Bruyn Ootber (1952), citado por Foster (1991). A partir desse relato, essa estirpe tem sido detectada em todas as regiões onde se cultiva a batata no mundo (Sampson & Taylor, 1968; Whight, 1970; Hiruki, 1974; Manzer et al., 1978; De Bokx & Piron, 1978; Talens, 1979; Khalil & Shalla, 1982; Moran et al., 1983; McDonald & Coleman, 1984; Wilson & Jones, 1990; Omer & El-Hassan, 1994; Franc & Banttari, 1996; Matousek, et al., 2000; Heldak., 2001; Boonham et al., 2003; Singh et al., 2004; Bystricka et al., 2005).

No Brasil, o vírus S foi relatado primeiramente por Cupertino et al., em 1970, quando procuraram descrever os resultados obtidos nos testes biológicos e sorológicos para o PVS, feitos em variedades de batata importadas e nacionais. Esses mesmos autores observaram que a maioria das cultivares, importadas e nacionais testadas, positivas no teste sorológico, induziu sintomas característicos em plantas de *C. quinoa*, que se mostrou uma excelente indicadora para esse vírus. Desde essa data, em todos os trabalhos sobre incidência, detecção e levantamentos de viroses em lavouras ou em cultivares de batata no Brasil, cita-se a presença do vírus S (Cupertino & Costa, 1970; Mizubuti, 1981; Daniels & Castro, 1984; Daniels, 1985; Figueira, 1985; Pio-Ribeiro et al., 1994; Hirano, 1995; Daniels, 1995; Figueira, 1995; Souza-Dias, 1995; Figueira, 1999; Figueira, 2002; Figueira, 2004; Barrocas et al., 2005b; Geraldino, 2006).

A estirpe Andina foi detectada por Hinojosa-Orihuela, em 1973. Nesse trabalho, a autora comparou a reação de isolados de PVS extraídos de cultivares de batata de origem peruana e européia em relação aos sintomas provocados em

plantas de *C. quinoa*. Ela observou que todas as plantas de *C. quinoa* infectadas com o isolado peruano de PVS exibiram sintomas sistêmicos, fato ainda não relatado anteriormente. Após essa constatação, todos os isolados de PVS que causam esse tipo de sintoma receberam o nome de isolado andino ou PVS^A, devido à sua similaridade com os peruanos (Foster, 1991). Esse tipo de isolado já foi detectado em várias partes do mundo, conforme relatado por Slack (1981), Rose (1983), Dolby & Jones (1987), Fletcher (1996), Mackenzie et al. (1989), Foster (1991), Cerovska & Filigarova (1995), Boonham et al. (2003), Matousek, et al. (2004) e Bystricka et al. (2005).

As lavouras brasileiras de batata, devido à grande importação de batata-semente de países onde a estirpe andina já foi detectada, correm o risco da introdução dessa estirpe no país. Até o presente momento, nenhum trabalho relatando a presença dessa estirpe no Brasil foi publicado, mesmo porque aqui esse vírus não tem sido objeto de pesquisas e a fiscalização do programa de certificação de sementes e mudas ainda é bastante deficiente.

2.5 Transmissão de isolados de PVS

A transmissão de vírus do gênero *Carlavirus* pode ocorrer mecanicamente e por afídeos de maneira não-persistente (Pirone & Blanc, 1996). Os isolados da estirpe PVS^O, além de serem transmitidos pelos tubérculos empregados como sementes, durante o plantio pode haver contaminação dos tubérculos, quando esses são cortados com lâminas contaminadas, uma vez que estudos comprovaram que a replicação viral é induzida por ferimentos produzidos nos tubérculos (Morelli & Vayda, 1996). No campo, podem ser disseminados por contato natural entre plantas vizinhas, por implementos agrícolas e roupas, nas operações mecânicas durante o transporte, a classificação e também no armazenamento, durante a fase de desenvolvimento dos brotos (Slack, 1983; Franc & Bantari, 1984; Beemster & De Bokx, 1987).

O mecanismo de transmissão do PVS^A é do tipo não-persistente ou estiletar. Nesse tipo de transmissão, tanto a aquisição quanto a inoculação do vírus pelo vetor são feitas em poucos segundos (James & Perry, 2004). Molecularmente, este tipo de transmissão, por vetores diversos, pode ser influenciada por dois fatores. O primeiro depende somente de características da proteína capsidial e o outro, apesar de também depender da proteína capsidial, depende de outros componentes não estruturais, conhecidos como “Helper component” (HC), como é o caso dos *Caulimovirus* e nos *Potyvirus* a proteína HC-Pro (Moya, 2002). No caso dos *Carlavirus*, existem evidências de que, além dessa depender da proteína capsidial, parece também depender da proteína 11kDa, que atuaria de modo parecido com a HC-Pro (Foster & Mills, 1991; Pirone & Blanc, 1996)

A taxa de transmissão do PVS^A pelo vetor é, geralmente, baixa e variável. Slack (1981) conseguiu transmissão do vírus em 3 das 23 plantas de *C. quinoa* inoculadas com o vetor *Myzus persicae*. Weidemann & Koenig (1990) observaram que a transmissão pelo *Myzus persicae* de isolados da estirpe Andina não é uniforme, pois as taxas de transmissão obtidas por eles foram de 2,4% e 8,5%, em plantas de *C. quinoa* inoculadas com um isolado oriundo da Alemanha e outro isolado proveniente da região dos Andes, respectivamente. Wardrop et al. (1989) testaram, além do *Myzus persicae*, várias espécies de afídeos, como *Aphis nasturtii*, *Macrosiphum euphorbiae*, *Aulocarthum solani* e *Rhopalosiphum padi*, na tentativa de transmitir o PVS^A de batata para batata e de batata para *Nicotiana debneyi*. Os resultados mostraram que o *Myzus persicae* infectou 5,9% das plantas de batata e o *Aphis nasturtii* infectou 14,3% de plantas, também batata, sob condições de laboratório. Nenhuma das espécies de afídeos testadas transmitiu o PVS^A de batata para *N. debneyi*.

Apesar da taxa de transmissão do PVS^A ser baixa, ainda assim essa estirpe oferece risco adicional para a produção de batata-semente no Brasil, uma vez

que, se não for diferenciada do PVS^O, as estratégias de controle e manejo se tornam mais complicadas.

2.6 Características biológicas, sorológicas e moleculares do PVS^A e PVS^O

2.6.1 Sintomatologia e gama de hospedeiras

Algumas variedades de batata mais suscetíveis podem apresentar, quando infectadas com o PVS, mosqueado bem leve, aprofundamento das nervuras na parte superior da folha, que pode se tornar rugosa e, às vezes, algumas cultivares podem apresentar a formação de uma banda quase imperceptível ao longo das nervuras. Entretanto, esses sintomas ocorrem raramente, uma vez que o sintoma provocado pelo PVS, na maioria das cultivares comerciais de batata, é geralmente latente, de tal modo que, em condições de campo, a inspeção visual se torna muito difícil (Figueira, 2002).

Para se certificar da presença do vírus na planta, faz-se o teste em plantas indicadoras. No caso do PVS, ele é capaz de infectar poucas espécies de hospedeiras, principalmente das famílias *Solanaceae*, *Chenopodiaceae* e *Amaranthaceae* (Wetter, 1971).

Os isolados de PVS^O causam apenas sintomas localizados em plantas hospedeiras, como *C. quinoa*, *C. amaranticolor* e *C. album* (Rose, 1983; Slack, 1983; Dolby & Jones, 1987; Wardrop, et al., 1989; Weidemann & Koenig, 1990; Foster et al, 1990; Fletcher, 1996; Garg et al., 2000) e, segundo Barrocas et al. (2005^a) plantas de tomate (*L. esculentum* cv. Santa Clara) também produziram sintomas quando inoculadas mecanicamente com alguns isolados de PVS^O, em duas épocas do ano. As plantas de tomate infectadas pelo vírus apresentaram anéis arroxeados na parte abaxial da folha, sintoma este, até então, ainda não relatado na literatura. Os sintomas localizados nas plantas de *C. quinoa* e *C. amaranticolor* aparecem cerca de 10 a 15 dias após a inoculação.

Os isolados de PVS^A são capazes de invadir sistemicamente plantas de *C. quinoa*. O desenvolvimento dos sintomas começa com 10 a 15 dias após a inoculação, com o surgimento de lesões locais que, com o passar do tempo, se tornam sistêmicas, caracterizando e diferenciando esse isolado do isolado comum (Hinostroza-Orihuela, 1973; Slack, 1981; Rose, 1983; Slack, 1983; Dolby & Jones, 1987).

2.6.2 Caracterização Sorológica

O teste *double antibody sandwich* ou DAS-ELISA é o preferido em trabalhos rotineiros de indexação de vírus, como no caso da certificação de batata-semente, devido a sua simplicidade, adaptabilidade, rapidez e sensibilidade, podendo ser utilizado em escala para diagnose de um grande número de amostras ao mesmo tempo (Figueira, 2000). Contudo, quanto à diferenciação sorológica das estirpes de PVS, elas só podem ser distinguidas por meio de anticorpo monoclonal, uma vez que o anticorpo policlonal, usado em testes de rotina nos laboratórios, reage positivamente para ambas as estirpes e o monoclonal não reage nem com a estirpe comum e nem com outros *Carlavirus* como *Poplar mosaic virus*, *Chrysanthemum virus B*, *Narcissus latent virus*, *Lily symptomless virus*, *Carnation latent virus*, *Carnation necrotic fleck virus* e *Potato virus M*.

Um ponto negativo na diagnose do PVS^A, utilizando anticorpo monoclonal, é que a reação só é positiva quando a capa protéica viral está intacta, ao contrário dos anticorpos policlonais que detectam o PVS, quer a capa esteja íntegra ou não (Cеровска & Filigarova, 1995).

2.6.3 Aspectos moleculares das duas estirpes do PVS

PVS é classificado como uma espécie pertencente ao gênero *Carlavirus* e à família *Flexiviridae* (Wetter, 1971).

As partículas dos isolados de PVS são alongadas e flexíveis, possuem simetria helicoidal, com 12 nm de diâmetro por 660 nm de comprimento e genoma único constituído por ssRNA positivo com 7,5 kb (Foster, 1991).

Na extremidade 3', as duas estirpes possuem cauda poli(A) dos RNAs genômicos e subgenômicos e uma estrutura do tipo “cap” no terminal 5' do RNA genômico da estirpe comum, enquanto que no PVS^A não possui VPg (Foster & Mills, 1990; Foster, 1991; Foster, 1992).

O RNA genômico de ambos os isolados, bem como de todos os membros do grupo *Carlavirus*, possuem seis ORFs (*open reading frame*) (Figura 1). a primeira ORF codifica a proteína replicase, com 223 kDa; a segunda, a terceira e a quarta formam um bloco triplo de genes que codificam as proteínas 25 kDa, 12 kDa e 7 kDa, respectivamente, envolvidas no movimento célula-célula; a quinta codifica a proteína capsidial com 34 kDa e a sexta e última, com 11kDa, parece estar relacionada à transmissão do vírus por afídeos. O PVS tem ainda três seqüências de nucleotídeo não codificadoras: 75 nucleotídeos no terminal 5', 38 nucleotídeos entre a replicase e o bloco triplo e 70 nucleotídeos seguindo a cauda poli A, no terminal 3' (Foster, 1992; Regenmortel et al., 2000).



FIGURA 1. Esquema de ORFs do genoma do *Potato virus S* (PVS) (National Center for Biotechnology Information - NCBI, 2007).

A análise bioquímica da capa protéica de dois isolados de PVS, sendo o PVS^O ROY e o PVS^A CE7260/12, foi feita por Foster & Mills (1990) e os testes feitos foram de peso molecular, análise de aminoácidos e mapeamento de peptídeos. Esses autores concluíram que as diferenças são mínimas entre os dois isolados, sendo o peso molecular do PVS^A é Mr = 34,000+/-200 enquanto o do PVS^O é Mr = 33,700+/-100. A identidade de nucleotídeos das duas estirpes é alta, evidenciando apenas um peptídeo adicional na digestão do PVS^A, não podendo ser usado como método para diferenciar os dois isolados. Na análise de aminoácidos, o número de resíduos de cada aminoácido foi calculado em picomoles e o resultado obtido foi que a única diferença entre os dois isolados estudados está na presença de uma única cisteína. Como conclusão, os autores mencionam que as diferenças nas propriedades biológicas do PVS^A e do PVS^O não se encontram nas propriedades bioquímicas dos dois isolados.

Considerando-se as seqüências homólogas dos RNAs de 5 isolados de PVS^O e 4 isolados de PVS^A, Foster & Mills (1990), usando a técnica de hibridização com cDNA, observaram alto grau de homologia, em torno de 90% a 100% entre os isolados. Esses autores concluíram que somente uma análise molecular da capa protéica pode distinguir o PVS^A do PVS^O.

Foster & Mills (1991) analisaram o grau de homologia de seqüências de aminoácidos da região 3'-terminal, de isolados Andinos e Comuns e observaram que a identidade entre as duas estirpes foi de cerca de 93% na região da capa protéica e de 79% na região da proteína 11kDa. As diferenças se situaram na região N-terminal em um bloco de 11 aminoácidos da capa protéica e de oito aminoácidos na 11kDa. Estes blocos de aminoácidos foram os responsáveis pelas diferenças substanciais entre as duas estirpes, refletindo nos sintomas causados por elas e na transmissão por afídeos da estirpe Andina, segundo esses autores.

Matousek et al. (2000) usaram RT-PCR e clonagem do cDNA para comparar a região da capa protéica de oito isolados de PVS, entre PVS^A e PVS^O, e encontraram média de 96,7% de homologia entre eles. As maiores diferenças entre a PVS^A e PVS^O foram observadas também na capa protéica e na proteína 11kDa. Em adição, eles encontraram também diferenças significativas na proteína 7kDa do bloco triplo que compõe a proteína de movimento.

No intuito de detectar várias viroses de batata ao mesmo tempo, Boonham et al. (2003) ajustaram a metodologia do microarray e detectaram os vírus PVY, PVX, PVA e PVS em infecções simples e mistas. Eles foram capazes de discriminar três isolados de PVY (PVY^O, PVY^N e PVY^{NTN}) e diferenciar dois isolados de PVS (PVS^O e PVS^A) usando *primers* por eles desenhados para amplificar um fragmento genômico utilizado como sonda de cDNA para hibridização com o RNA viral. No caso dos isolados de PVS, os *primers* amplificaram as seqüências correspondentes ao gene da capa protéica dessas estirpes, que apresentaram grau de homologia de 80,1%, evidenciando mais uma vez que a capa protéica é a responsável pelas diferenças substanciais entre os isolados de PVS.

Um ano depois, para estudar a variabilidade existente entre os isolados de PVS^A e PVS^O, Matousek et al. (2004) fizeram a análise de cDNA derivado do terminal 3' do genoma de PVS usando RT-PCR e métodos termodinâmicos. Foram avaliados 23 isolados de PVS, incluindo 14 isolados denominados de variante do PVS Andino (CS - *Chenopodium* sistêmico), que causam infecção sistêmica em *C. quinoa*. Foram sondados também 16 isolados oriundos de cultivares de batata da Alemanha e mais 4 isolados (Yuguima, Peruanita, Olívia e Blaue mandel) selecionados por causar também sintoma sistêmico em *C. quinoa*. A região genômica estudada foi entre a proteína 7kDa e a capa protéica. Este trabalho demonstrou que todos os isolados europeus são divergentes do PVS^A, devido à reação negativa com o *primer* andino. Foi feita a análise da

biblioteca de cDNA de ambos os isolados, ficando evidente que os dois grupos de cDNA diferiram em posições de nucleotídeos diferentes, especialmente dentro da região final 5' do gene da capa protéica, sugerindo substituição e divergência entre os dois grupos.

Bystricka et al. (2005) propuseram novo método para diagnosticar várias viroses de batata e, ainda, distinguir as principais estirpes do PVY e do PVS, utilizando oligômeros curtos, de 40 nucleotídeos, como sondas para hibridização com segmentos genômicos específicos e distintos desses vírus. No caso do PVS, foram confeccionadas as seguintes sondas: S1 para o gene da proteína 11kDa do PVS^O, S2 para o gene da capa protéica do PVS^A, S3 para o gene da proteína 12kDa do PVS^A e S4 para a região 5'-terminal da capa protéica do PVS^A. Os autores observaram que não houve hibridização da sonda S1 com nenhum isolado de PVS^A nem das sondas S3 e S4 com isolados de PVS^O; apenas houve uma hibridização bem fraca entre a sonda S2 e um isolado de PVS^O, que correspondem a 85% de similaridade nessa seqüência. Esses resultados contradizem a hipótese de que a proteína 11kDa do PVS^A (Foster & Mills, 1991; Matousek et al., 2000) esteja envolvida nas diferenças entre as duas estirpes do PVS e evidencia, mais uma vez, pela hibridização da sonda S2, que as duas estirpes podem ser distinguidas por meio da comparação das suas capas protéicas.

2.7 Perdas causadas pelo PVS

Conforme relatado anteriormente, quando uma planta de batata se encontra infectada somente com o vírus S, as perdas na produção giram em torno de 10% a 20% (Figueira, 1999). Entretanto, podem ocorrer infecções mistas, ou seja, vários vírus associados a uma mesma planta. Nesse caso, as perdas causadas pela interação entre o PVS e outros vírus importantes na cultura da batata podem ser bastante significativas.

Para estudar o efeito combinado do PVS com o PVX em cultivares economicamente importantes no Canadá, Whright (1970) erradicou esses vírus por meio de incisão e de tratamento de brotos auxiliares e obteve aumento na produção de tubérculos de 10% a 32%, com conseqüente aumento na produção total de 11% a 38%, mostrando que, quando o PVS está associado ao PVX, ocorre drástica queda na produção. Essa interação é muito importante, visto que ambos os vírus são latentes na grande maioria das cultivares de batata comerciais, podendo, assim, passar despercebidos em uma inspeção visual no campo.

Outro trabalho evidenciando a redução na produção de batata devido à associação de PVS com PVX foi realizado por Manzer et al. (1978). Esses autores avaliaram a interação do PVS com dois isolados de PVX, um que apresentava sintomas leves e outro que apresentava sintomas moderados, durante três anos. Concluíram que ocorreu diminuição de 3% na produção em todas as plantas infectadas somente com o PVS, em relação às plantas livres de vírus. Quando o PVS foi combinado com o PVX de sintoma leve, a queda na produção foi de 2% e, quando combinado com o PVX de sintomas moderados, a queda foi de 5%, além de induzir sintomas de mosaico bem visível.

Marton et al. (1993) observaram, nas cultivares de batata Achat e Baronesa, inoculadas separadamente com PVS e PVY e na cultivar Achat, inoculada conjuntamente com o PLRV e PVS, houve redução na produção de 57,92% e de 51,47% para o PVY e PVS, respectivamente na cultivar Baronesa e diminuição na cultivar Achat para o PVY de 67,01%, para o PVS de 49,29% e quando o PLRV se encontra associado ao PVS a redução na produção foi de 77,55%.

Além de perdas na produção, a presença do PVS associado a outros vírus de batata pode intensificar os sintomas causados pelos outros vírus. Segundo Figueira et al. (1985), para verificar a ocorrência de viroses na região do Sul de

Minas Gerais, foram inspecionados campos de produção de batata consumo e semente. Foram coletados hastes e os tubérculos provenientes dessas plantas com suspeita de viroses, que foram analisadas pelo teste sorológico ELISA para a detecção de vírus. De 147 plantas com sintomas de mosaico, todas estavam infectadas com PVY; uma delas continha também PVX e outra PVS e ambas apresentaram o sintoma de mosaico necrótico mais severo.

Foi desenvolvido um trabalho com variedades de batata economicamente importantes no Brasil. Nessas foi inoculado mecanicamente o PVY e, vinte dias após a inoculação, foram enxertadas hastes contaminadas com PVS para que fossem investigados os sintomas de uma infecção mista de PVY e PVS. Todas as plantas com infecção mista apresentaram mosaico mais intenso e enrugamento, com visível diminuição da área foliar na parte apical da planta, o que preconiza diminuição também da produção (Geraldino et al., 2005).

3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGRIANUAL. **Anuário da agricultura brasileira**. São Paulo: FNP, Consultoria e Comércio, 2007.
- BARROCAS, E.N.; FIGUEIRA, A.R.; GALVINO, S.B.F.; PEREIRA, S.L. FERRO, H.M. Reação de plantas hospedeiras a isolados do vírus S da batata (*Potato virus S – PVS*). **Fitopatologia Brasileira**, v.30, p.190. 2005.
- BEEEMSTER, A.B.R.; DE BOKX, J.A. Survey of properties and symptoms. In: De BOKX, J.A.; Van der WANTS. (Ed.). **Viruses of potato and seed potato production**. 2.ed. Wageningen: Pudoc, 1987. p. 84-113.
- BYSTRICKA, D.; LENZ, O.; MRAZ, I.; PIHEROVA, D.; KMOCH, S.; SIP, M. Oligonucleotide-based microarray: a new improvement in microarray detection of plant viruses. **Journal of Virological Methods**, v.128, p. 176-182, 2005.
- BOONHAM, N.; WALSH, K.; SMITH, P.; MADAGAN, K.; GRAHAM, I.; BARKER, I. Detection of *Potato viruses* using microarray technology: towards a generic method for plant viral disease diagnosis. **Journal Virology Methods**, v.108, n.2, p.181-187, 2003.
- CEROVSKA, N.; FILIGAROVA, M. Specific detection of Andean strain of *Potato virus S* by monoclonal antibodies. **Annual Applied Biology**, v.127, p.87-93, 1995.
- CUPERTINO, F.P.; COSTA, A.S. Avaliação das perdas causadas por vírus na produção da batata. **Bragantia**, v.29, p.337-345, 1970.
- CUPERTINO, F.P.; OLIVEIRA, A.R.; COSTA A.S. Presença do vírus S em batata-semente nacional e estrangeira. **Bragantia**, v.29, p.17-20, 1970. Nota 4.
- DANIELS, J. Efeito de viroses em batata plantadas no Rio Grande do Sul. **Fitopatologia Brasileira**, v.11, p.302, 1985.
- DANIELS, J. Viroses da batata e suas implicações na produção de batata semente no Rio Grande do Sul. **Summa Phytopathologica**, v.21, n.3/4, p.269-270, 1995.
- DANIELS, J.; CASTRO, L.A. Incidência de viroses em lavouras de batata no Rio Grande do Sul. **Fitopatologia Brasileira**, v.9, p.398, 1984.

DE BOKX, J.A.; PIRON, P.G.M. Detectability of *Potato virus S* in field-grown plants. **Medicine Fac. Landbouw Rijsuniv. Gent.**, Wargening, v.43, n.2, 1978.

DOLBY, C.A.; JONES, R.A.C. Occurrence of the Andean strain of *Potato virus S* in imported potato material and its effects on potato cultivars. **Plant Pathology**, v.36, p.381-388, 1987.

FIGUEIRA, A.R. Viroses da batata e suas implicações na produção da batata-semente do Estado de Minas Gerais: histórico do problema e soluções. **Summa Phytopathologica**, n.21, p.269-270, 1995.

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

FIGUEIRA, A.R. **Manejo de doenças viróticas**. Lavras: UFLA/FAEPE, p. 24-34, 2000.

FIGUEIRA, A.R. Vírus S (*Potato virus S*- PVS), PVX (*Potato virus X*- PVX): Qual seria sua importância para a bataticultura Brasileira? **Batata Show**, Itapetininga, v.2, n.4, p.8-11, maio 2002.

FIGUEIRA, A.R.; BARROCAS, E.N.; GIRÃO, L.V.C. Incidência do potato vírus S (PVS) nas sementes de batata analisadas no Centro de Indexação de vírus de Minas Gerais nos dois últimos anos. **Fitopatologia Brasileira**, v.29, p.S240, ago. 2004.

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

FLETCHER, J.D. *Potato virus S^A* – Characteristics of an isolate from New Zealand. **New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science**, Christchurch, New Zealand, v.24, p.335-339, 1996.

FOSTER, G.D. Molecular variation between ordinary and Andean strain of *Potato virus S*. Mini-Review. **Research in Virology**, Paris, v.142, p.413-416, 1991.

- FOSTER, G.D. The structure and expression of the genome of *Carlavirus*. Mini-review. **Research in Virology**, Paris, n.143, p.103-112, Feb. 1992.
- FOSTER, G.D.; MILLS, P.R. Investigation of the 5' terminal structure of genomic and subgenomic RNAs of *Potato virus S*. **Virus Genes**, v.4, n.4, p-359-366, 1990.
- FOSTER, G.D.; MILLS, P.R. Analysis of the coat proteins of the ordinary and Andean strains of *Potato virus S* and antigenic comparisons of *Carlavirus*. **Acta Virologica**, v.35, p.184-190, 1991.
- FOSTER, G.D.; MILLS, P.R. The 3'-nucleotide sequence of an ordinary strain of *Potato virus S*. Botany Department, University of Leicester, UK. **Virus Genes**, v.6, n.3, p.213-320, Aug. 1992.
- FRANC, G.D.; BANTTARI, E.E. The transmission of *Potato virus S* by the cutting knife and retention time of infections PVS on common surfaces. **American Potato Journal**, v.61, p.253-260, 1984.
- FRANC, G.D.; BANTTARI, E.E. Translocation and mechanical spread of a Minnesota isolate of *Potato virus S* in potatoes. **American potato Journal**. v.73, p.123-133, 1996.
- GARG, I.D.; VINAYAK-HEGDE; HEGDE, V. Biological characterization, preservation and ultrastructural studies of Andean strain of *Potato virus S*. **Indian Phytopathology**, v.53, n.3, p.256-260, 2000.
- GERALDINO, P.S. Incidência de vírus em sementes de batata no estado de Minas Gerais – Brasil. In: CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UFLA – CIUFLA, 2006, Lavras. **Trabalhos...** Lavras: UFLA, 2006.
- GERALDINO, P.S.; FIGUEIRA, A.R.; BARROCAS, E.N.; GALVINO, S.B.F.; FERRO, H.M. Efeito sinérgico entre o PVS (*Potato virus S*) e o PVY (*Potato virus Y*) em diferentes cultivares de batata. **Fitopatologia Brasileira**, v.30, p.S186, 2005.
- GERMAN, T.L. *Potato virus S*. In: STEVENSON, W.R. et al. (Ed.). **Compendium of potato diseases**. 2.ed. St Paul, 2001. p.67.
- HELDAK, J. Detection of *Potato virus S* by RT-PCR in potato regenerants derived from *in vitro* heat-treated shoot tips. **Acta Fytotechnica et Zootechnica**. v.4, p.275-277, 2001.

HINOSTROZA-ORIHUELA, A.M. Some proprieties of *Potato virus S* isolated from Peruvian potato varieties. **Potato Research**, v.16, p.244-250, 1973.

HIRUKI, C. Factors affecting bioassay of *Potato virus S* in *Chenopodium quinoa*. **Phytopathology**, v.65, p.1288-1292, 1974.

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

HOOKE, W.J. **Compendium of Potato Diseases**. Saint Paul: American Phytopathological Society, 1981.125p.

HOOKE, W.J. **Compendium of Potato Diseases**. Saint Paul: American Phytopathological Society, v.125, p.72-74, 2001.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Levantamento sistemático da produção agrícola**. Grupo de Coordenação de Estatísticas Agropecuárias/GCEA/DPE/COAGRO, 2007. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br>>. Acesso em: 01 jun. 2007.

JAMES, C.K.; PERRY, L.K. Transmission of plant viruses by aphid vector. **Molecular Plant Pathology**, v.5, n.5, p.505-511, 2004.

KHALIL, E.M.; SHALLA, T.A. Detection and spread of *Potato virus S*. **Plant Disease**, v.66, n.5, p.368-371, 1982.

MACKENZIE, D.J.; TREMAINE, J.H.; STACE-SMITH, R. Organization and intervirial homologies of the 3'-terminal portion of *Potato virus S* RNA. **Journal of General Virology**, v.70, p.1053-1063, 1989.

MANZER, F.E.; MERRIAM, D.C.; HELPER, P.R. Effects of *Potato virus S* and two strains of *Potato virus X* on yield of Russet Burbank, Kennebec, and Katahdin cultivars in Maine. **American Potato Journal**, v.55, p.601-609, 1978.

MÁRTON, L. BUSO, J.A.; DUSI, A.N., REIS, N.V.B. Degenerescência devido a viroses em cultivares de batata. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.11, p.82, 1993. Resumos.

MATOUSEK, J.; PTACEK, J.; SCHUBERT, J.; KOZLOVA, P.; SKOPEK, J.; DEDIC, P. Molecular Probing of PVS genome by immocapture RT-PCR and by thermodynamic analysis. In: EAPR VIROLOGY SECTION MEETING, 12., 2004, Rennes. **Abstracts...** Rennes, France: INRA, 2004. Poster 19, p.40.

MATOUSEK, J.; SHUBERT, J.; DEDIC, P.; PTACEK, J. Abroad variability of *Potato virus S* (PVS) revealed by analysis of virus sequences amplified by reverse transcriptase-polymerase chain reaction. **Canadian Journal of Plant Pathology**, v.22, p.29-37, 2000.

MC DONALD, J.G.; COLEMAN, W.K. Detection of *Potato viruses* Y and S in tubers by ELISA after breaking of dormancy with Bromoethane or Rindite. **American Potato Journal**, v.61, p.619-622, 1984.

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

MOYA, J.J.L. Genes involved in insect-mediated transmission of plant viruses. In: KHAN, J.A.; DIJKSTRA, J. (Ed.). **Plant viruses as molecular pathogens**. New York: London: Oxford, 2002. p.31-49.

MORAN, J.R.; GARRET, R.G.; FAIRWEATHER, J.V. Strategy for detecting low levels of *Potato viruses* X and S in crop and its application to the Victoria certified seed potato scheme. **Plant Disease**, v.67, n.12, p.1325-1327, 1983.

MORELLI, J.K.; VAYDA, M.E. Mechanical wounding of potato tubers induces replication of *Potato virus S*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v.49, p.33-47, 1996.

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION (NCBI) **Corenucleotideos**. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/VIRUSES/vifam.html>>. Acesso em: 01 jul. 2007.

OMER, A.D.; EL-HASSAN, S.M. Location and cultivar variations in the prevalence of *Potato virus* diseases in the Sudan. **Tropical Agriculture**, Trinidad, v.71, n.3, jul. 1994.

- PEREIRA, A.S. Composição química, valor nutricional e industrialização. In: REIFSCHNEIDER, F.J.B. **Produção de batata**. Brasília: Linha gráfica e Editora, 1987. v.1, p.12-28.
- PINTO, C.A.B.P. Cultivares de batata resistentes a viroses. **Batata Show**, Itapetininga, v.3, n.7, p.11, jul. 2003.
- PIO-RIBEIRO, G.; ASSIS FILHO, F.M.; PIRES, C.R.C. Detecção sorológica de vírus em uma coleção de batata (*Solanum tuberosum*) no estado do Pernambuco. **Fitopatologia Brasileira**, v.19, n.3, p.473-475, 1994.
- PIRONE, T.P.; BLANC, S. Helper-dependent vector transmission of plant viruses. **Annual Review Phytopathology**, v.34, p.227-247, 1996.
- REGENMORTEL, M. **Virus taxonomy**: Genus *Carlavirus*. San Diego: Academic, 2000. p.475-478. (Seventh Report of International Committee on Taxonomy of Virus).
- ROSE, D.G. Some properties of an unusual isolate of *Potato virus S*. **Potato Research**, v.26, p.49-62, 1983.
- SAMPSON, P.J.; TAYLOR, R.H. A comparison of the electron microscope, microprecipitin tests, and indicator plants for the detection of *Potato viruses S, X* and *Y*. **Phytopathology**, v.58, p.489-493, 1968.
- SLACK, S.A. Identification of an unusual strain of *Potato virus s* in North America. **Phytopathology**, v.71, n.255, 1981.
- SLACK, S.A. Identification of an isolate of the Andean strain of *Potato virus S* in North America. **Plant Disease**, v.67, n.7, 1983.
- SING, R.P.; DILWORTH, D.A.; SING, M.; McLAREN, D.L. Evaluation of a simple membrane-based nucleic acid preparation protocol for *Potato viruses* from aphid and plant tissues. **Journal of Virological Methods**, v.121, p.163-170, 2004.
- SOUZA DIAS, J.A.C. Viroses da batata e suas implicações na produção de batata-semente no Estado de São Paulo. **Summa Phytopatologica**, n.21, p.264-266, 1995.
- SOUZA-DIAS, J.A.C.; SILVA, P.R. *Potato virus S* (PVS) in imported seed-potato stocks of 'ATLANTIC'. **Fitopatologia Brasileira**, v.26, p.538, ago. 2001.

- TALBURT, W.F.; SCHWIMMER, S.; BURR, H.K. Structure e chemical composition of the potato tubers. In: TALBURT, W.F.; SMITH, O. **Potato Processing**, p. 11-42, 1975.
- TALENS, L.T. *Potato viruses* in the Philippines: detection and identification of *Potato viruses* X, S and Y. **Philippine Agriculturist**, v.52, p.144-148, 1979.
- VECHI, C.; HIRANO, E. Situação da batata-semente no Brasil. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.2, p.55-58, 1984.
- WARDROP, E.A. Aphid transmission of *Potato virus S*. **American Potato Journal**, v.66, p.449-459, 1989.
- WEIDEMANN, H.L.; KOENIG, R. Differentiation of isolates of Potato Virus S which infect *Chenopodium quinoa* systemically by means of quantitative c DNA hybridization tests. **Zeitschrift-fur-Pflanzenschutz**, v.3, n.97, p.323-327, 1990.
- WETTER, C. **Description of plant viruses: *Potato virus S***. Surrey, England: Commonw. Mycol. Inst. /Assoc.Appl.Biol.,Kew. 1971. n.60.
- WILSON, C.R.; JONES, A.C. Virus content of seed potato stocks produced in a unique seed potato production scheme. **Annual Applied Biologists**, n.116, p.103-109, 1990.
- WRIGHT, N.S. Combined effects *Potato viruses* X and S on yield of Netted Gem and White Rose potatoes. **American Potato Journal**, v.47, p.475-478, 1970.

CAPÍTULO 2

CARACTERIZAÇÃO BIOLÓGICA E MOLECULAR DE ISOLADOS DE *Potato virus S* (PVS) NO BRASIL

RESUMO

RIBEIRO, Sílvia Regina Rodrigues de Paula. Caracterização biológica e molecular de isolados de *Potato virus S* (PVS) no Brasil. In: _____. **Caracterização de isolados de *Potato virus s* (PVS) no Brasil e seu efeito na produção de batata.** 2007. Cap. 2, p.26-59. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.*

Para caracterizar biológica e molecularmente os isolados de PVS no Brasil, foram coletados oito isolados a partir de tubérculos de batata indexados no Centro de Indexação de Vírus de Minas Gerais, um do Rio Grande do Sul e um no Estado de São Paulo. Estes foram inoculados mecanicamente em dez espécies plantas, para observação dos sintomas. Para caracterização molecular foram desenhados primers para amplificar um fragmento de 908pb, englobando a região da capa protéica (CP) da estirpe comum (PVS^O), e para o isolado que não pode ser amplificado por esses primers foram empregados os descritos na literatura para a estirpe Andina (PVS^A), capaz de amplificar um fragmento com 949pb, também contendo a região CP. Das plantas testadas somente três espécies foram suscetíveis: as plantas de tomate (*Lycopersicon esculentum*) foram suscetíveis apenas aos isolados SJ-CHI e SJ-CAL, apresentando anéis arroxeados na face inferior da folha; as plantas de *Chenopodium quinoa* e *C. amaranticolor* apresentaram lesões locais cloróticas quando inoculadas com todos os isolados, exceto com o isolado BB-AND que provocou sintoma sistêmico em plantas de *C. quinoa*. Esse isolado, quando submetido a testes de transmissão por meio do vetor *Myzus persicae*, foi transmitido para 11% das plantas de *C. quinoa* inoculadas. Os primers desenhados para a região da CP do PVS^O amplificaram o fragmento esperado para nove dos isolados. O BB-AND somente foi amplificado com os primers desenhados para o PVS^A. O alinhamento múltiplo dos nucleotídeos mostrou que as identidades entre os 9 isolados amplificados com os primers para o PVS^O, variaram entre 92 e 98%. Entretanto, entre eles e o BB-AND foi entre 75 a 77%. A identidade desses 9 isolados com os demais isolados do PVS^O do GenBank variou entre 91 e 98%, e, com os de PVS^A, entre 79 e 81%. A identidade do BB-AND com o isolados de PVS^O disponíveis no GenBank variou entre 76 a 78% e, com o isolados de PVS^A, entre 81 e 85%. Considerando-se o alinhamento múltiplo de aminoácidos, a identidade entre os nove isolados detectados no Brasil ficou entre 93 e 98%, e entre eles e o BB-AND foi de 83 a 86%. A identidade entre os 9 isolados e os

* Orientadora: Antônia dos Reis Figueira – UFLA

* Co-Orientador: César Augusto Brasil Pereira Pinto – UFLA

isolados de PVS^O do GenBank foi de 91 a 99% e entre eles e os isolados PVS^A foi de 86 a 94%. Finalmente, a identidade entre o BB-AND e os isolados PVS^O do GenBank variou entre 83 e 85% e entre ele e os isolados de PVS^A foi de 86 a 88%. Nas árvores filogenéticas baseadas nas seqüências de nucleotídeos e de aminoácidos, os nove isolados tiveram uma tendência de se agrupar com os demais isolados de PVS^O do GenBank, enquanto que o BB-AND, apesar de ter se agrupado com os isolados PVS^A, ficou localizado em um ramo distinto, indicando uma considerável distância filogenética entre eles. Esses dados indicam que o BB-AND é um isolado Andino do PVS, distante filogeneticamente dos isolados da Inglaterra, República Tcheca e Canadá, indicando uma origem geográfica possivelmente diferente. Ele deve ter sido introduzido no Brasil provavelmente via sementes de batata importadas, passando a ser um novo problema para a bataticultura nacional.

ABSTRACT

RIBEIRO, Silvia Regina Rodrigues de Paula Biological and Molecular characterization of Brazilian *Potato virus S* (PVS) isolates. In: _____. **Characterization of the *Potato virus S* (PVS) strains in Brazil and effect on potato tuber yield.** 2007. Cap. 2, p.26-59. Thesis (Doctorate in Phytopathology) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.*

In order to make the biological and molecular characterization of PVS Brazilian isolates, eight viral isolates were collected from the potato tubers indexed at the Center of Virus Indexation of Minas Gerais State, one from Rio Grande do Sul State and one from São Paulo State, Brazil. They were mechanically inoculated in ten species of plants, for observing the symptoms. For molecular characterization, primers were drawn to amplify a fragment of 908bp, including the area of the viral coat protein (CP) of the common strain (PVS^O). The PVS isolates that were not amplified by those primers, were amplified by using the primers described for the Andean strains (PVS^A), which allow the amplification of a fragment with 949bp, also containing the CP region. Among the inoculated plants, only three species were susceptible: the tomato plants (*Lycopersicon esculentum*) were susceptible only to isolates SJ-CHI and SJ-CAL, showing purple rings in the inferior face of the leaf; the plants of *Chenopodium quinoa* and *Chenopodium amaranticolor* presented chlorotic local lesions when inoculated with nine isolates. *C. quinoa* showed systemic symptoms only when inoculated with BB-AND isolate. When the BB-AND was submitted to tests of transmission by the vector *Myzus persicae*, it was transmitted to 11% of the inoculated *C. quinoa* plants. The primers designed for the CP region of common PVS isolates (PVS^O) amplified the expected fragment for nine of the ten isolates studied. BB-AND was only amplified with the primers designed for PVS^A. The multiple nucleotide alignment among the nine Brazilian PVS isolates, which were amplified with primers for PVS^O, showed an identity between 92 and 98%. However the identity among them and BB-AND, which was amplified only with primers for PVS^A, ranged from 75 to 77%. The identities among those nine isolates and the PVS^O isolates from GenBank were between 91 and 98%, and among them and PVS^A isolates were between 79 and 81%. The identities of BB-AND with the PVS^O isolates from GenBank ranged from 76 to 78%, and with others PVS Andean isolates the identities were from 81 to 85%. The identities of the amino acids were between 93 and 98%, among the nine Brazilian isolates, and the identities among those PVS isolates and BB-AND ranged from 83 to 86%.

* Guidance committee: Antônia dos Reis Figueira – UFLA (Adviser)
César Augusto Brasil Pereira Pinto – UFLA

When compared with the PVS^O isolates from GenBank, the identities of the 9 Brazilian isolates were from 91 to 99%, and the identities of BB-AND ranged from 83 and 85%. The identity of BB-AND with Andean isolates were from 86 to 88%. The phylogenetic trees based on nucleotide sequences of the nine Brazilian isolates had a tendency of grouping with the other PVS^O isolates of from GenBank, while BB-AND, in spite of having grouped with other PVS^A isolates, was located in a different branch, indicating a considerable phylogenetic distance among them. This study indicates that BB-AND is one Andean isolate of PVS, phylogenetically distant of the isolates of England, Czech Republic and Canada, indicating a possibly different geographical origin. It must have been introduced in Brazil probably by imported seed potato, becoming a new problem for the national potato growers.

1 INTRODUÇÃO

O *Potato virus S* (PVS) é classificado como uma espécie pertencente ao gênero *Carlavirus* (Wetter, 1971) que, apesar de ser um dos gêneros com maior número de espécies, até recentemente tem sido o menos estudado. Isso porque a maioria dos *Carlavirus* causa sintomas latentes e, quando são visíveis, podem ser observados apenas nos estágios iniciais da infecção, dependendo da hospedeira. Assim sendo, esse gênero de vírus tem sido esquecido e, na maioria dos casos, as espécies só mereceram atenção devido às alterações nos sintomas, quando estão associados a infecções complexas com outros vírus (Foster, 1992).

De modo geral, a maioria dos isolados do PVS comum (PVS^O) induz sintomas semelhantes nas principais plantas indicadoras, como, por exemplo, lesões cloróticas locais em plantas de *Chenopodium quinoa*. O mesmo ocorre com a maioria das diferentes cultivares de batata, nas quais, geralmente, são latentes (Foster, 1991). Poucas são as cultivares capazes de mostrar forte rugosidade, mosaico bronzeado e necrose na face superior da folha, além de diminuição no tamanho dos tubérculos.

Os isolados de PVS^O não são transmissíveis por meio do vetor. Sua disseminação no campo ocorre por meios mecânicos, como contato entre as plantas, ferramentas, etc. Entretanto, um novo isolado de PVS foi encontrado no Peru, capaz de induzir sintomas sistêmicos em plantas de *Chenopodium quinoa* (Hinojosa-Orihuela, 1973). Alguns anos depois, isolados semelhantes foram encontrados por outros autores, sendo denominado de PVS Andino (PVS^A), devido a sua semelhança com o isolado do Peru. Foi descoberto também que esses isolados podem ser transmitidos por afídeos como o *Myzus persicae*, a uma taxa variável entre 2% a 14% (Slack, 1981; Rose, 1983; Slack, 1983; Wardrop et al, 1989; Fletcher, 1996; Weidemann & Koenig, 1990; Foster & Mills, 1990; Foster, 1991; Foster & Mills, 1991; Foster, 1992; Foster & Mills,

1992; Garg et al., 2000; Matousek et al., 2004). Isso faz com que esses isolados sejam mais importantes, pois a sua disseminação no campo é mais eficiente.

Além de poderem ser diferenciados por inoculação em planta de *C. quinoa* e pela sua transmissão através do vetor, os isolados de PVS^O e PVS^A também podem ser distinguidos pelo teste DAS-ELISA, utilizando anti-soro monoclonal específico, uma vez que o anti-soro policlonal reage positivamente para as duas estirpes (Cerovska & Filigarova, 1995).

Mesmo que os testes citados possam diferenciar as estirpes do vírus S, melhor caracterização só é possível por meio de testes moleculares, que são mais sensíveis e fornecem informações mais precisas. Com a confecção de *primers* específicos, podem ser estudadas regiões do genoma viral capazes de detectar diferenças em poucos nucleotídeos, como é o caso da região da capa protéica, na qual foram encontradas as maiores diferenças entre as duas estirpes (Foster et al., 1990; Foster & Mills, 1991; Foster, 1992; Matousek et al., 2000; Boonham et al., 2003; Matousek, et al., 2004; Bystricka, et al., 2005).

No Brasil, entretanto, estudos a respeito do PVS são bastante escassos, mas são necessários, pois esse vírus foi incluído recentemente na lista de pragas não quarentenárias regulamentadas. Isso ocorreu devido à abertura das importações de batata-semente de países nos quais esse vírus ocorre em altas incidências. Assim sendo, o risco da introdução da estirpe PVS^A não pode ser negligenciado, pois não se sabe como será o comportamento da mesma nas condições brasileiras.

Este trabalho foi realizado com a finalidade de fazer a caracterização dos isolados de PVS presentes no Brasil, para determinar a sua possível classificação e procedência.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Local

Os experimentos foram conduzidos em casa de vegetação, no Centro de Indexação de Vírus de Minas Gerais e no Laboratório de Virologia Molecular do Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Lavras, no município de Lavras, Minas Gerais.

2.2 Origem dos isolados de PVS

Dos dez isolados estudados, oito foram detectados pelo Centro de Indexação de Vírus de Minas Gerais e dois foram gentilmente cedidos pela professora Jurema Schons, da Universidade de Passo Fundo, RS (BAR) e pela Cooperbatata (SJ-AST), de Vargem Grande do Sul, SP.

TABELA 1. Isolados de *Potato virus S* (PVS) coletados no Brasil.

Nome	Origem	Cultivar
SJ-CAL	São João da Boa Vista (SP)	Cal Red
SJ-CHR	São João da Boa Vista (SP)	Cherry
SJ-CHI	São João da Boa Vista (SP)	Chipeta
SJ-ATL	São João da Boa Vista (SP)	Atlantic
SM-AST	Sapucaí Mirim (MG)	Asterix
BB-AND	Bueno Brandão (MG)	Monalisa
PE-SHE	Perdizes (MG)	Shepody
RS-BAR	Ibirairas (RS)	Baronesa
AL-VIV	Alfenas (MG)	Vivaldi
SJ-AST	São João da Boa Vista (SP)	Asterix

2.3 Caracterização biológica

2.3.1 Sintomatologia e gama de hospedeiras

Após a detecção do isolado de PVS nos tubérculos indexados, eles foram multiplicados e analisados pelo teste sorológico ELISA para outros vírus, como *Potato virus X* (PVX), *Potato virus Y* (PVY) e *Potato leafroll virus* (PLRV), para assegurar que não estavam infectados por outros vírus. Parte dos tubérculos foi armazenada em câmara fria, para ser plantada sempre que necessário recuperar o vírus para estudo.

Para o estudo dos sintomas induzidos pelos isolados do PVS, foram inoculadas mecanicamente dez plantas de dez espécies (Tabela 2), em três repetições. Essas plantas foram inoculadas mecanicamente com cada isolado, separadamente, para evitar risco de contaminação.

Na inoculação mecânica, o extrato obtido por maceração de 1g de folhas infectadas com os diferentes isolados de PVS em 10 mL de solução de fosfato de potássio (K_2HPO_4) 1%, pH 8,0 (Hiruki, 1974), foi friccionado nas plantas-teste previamente polvilhadas com carborundum (400 mesh). Em seguida, as folhas foram lavadas com água e as plantas mantidas em casa de vegetação até o final da avaliação dos sintomas. Esse procedimento foi realizado em duas épocas distintas do ano, de julho a agosto de 2006, no inverno e de fevereiro a abril de 2007, no verão.

TABELA 2. Espécies de plantas inoculadas com os isolados de *Potato virus S* (PVS) estudados.

Espécie	Família	Nome popular
<i>Alternanthera tenella</i> Colla, 1829	<i>Amaranthaceae</i>	Sempre-viva
<i>Amaranthus viridis</i> L., 1763	<i>Amaranthaceae</i>	Caruru
<i>Capsicum annuum</i> L., 1753	<i>Solanaceae</i>	Pimentão
<i>Chenopodium amaranticolor</i> Coste & Reyn., 1907	<i>Chenopodiaceae</i>	Mirra
<i>Chenopodium quinoa</i> Willd., 1797	<i>Chenopodiaceae</i>	Quinoa
<i>Datura stramonium</i> L., 1753	<i>Solanaceae</i>	Orelha-de-macaco
<i>Gomphrena globosa</i> L., 1753	<i>Amaranthaceae</i>	Perpétua-roxa
<i>Lycopersicon esculentum</i> Mill., 1768 cv. Santa Clara	<i>Solanaceae</i>	Tomate
<i>Nicotiana rustica</i> L., 1763	<i>Solanaceae</i>	Tabaco sagrado
<i>Nicotiana tabacum</i> L., 1753 cv. Turkish NN (TNN)	<i>Solanaceae</i>	Tabaco ou fumo

2.3.2 Teste de transmissão por vetor

Os pulgões, da espécie *Myzus persicae* Sulz., foram criados em plantas sadias de *Datura stramonium*, sob condições de laboratório. Antes do período de aquisição, os pulgões foram deixados em jejum por 30 minutos e, depois, colocados em plantas de batata infectadas com PVS para se alimentarem por 30 minutos, no primeiro teste e por 24 horas, no segundo teste. Após o período de 30 minutos, foram transferidos 10 pulgões para cada uma das 20 plantas de *Chenopodium quinoa* e 5 plantas de batata de cada cultivar, Emeraude e Gredine, nas quais foram deixados por 24 horas para a transmissão, antes de

serem eliminados com inseticida. Em seguida, essas plantas foram levadas para a casa de vegetação, onde permaneceram até a avaliação final dos sintomas. O mesmo procedimento foi empregado após o período de aquisição de 24 horas, tendo os pulgões sido transferidos para 10 plantas de cada cultivar de batata Opaline e Soléia para 24 plantas de *C. quinoa*.

2.4 Teste sorológico

As plantas utilizadas como fonte de inóculo e as inoculadas mecanicamente ou pelo vetor com os isolados de PVS foram submetidas ao teste sorológico DAS-ELISA (Clark & Adams, 1977), empregando-se anti-soros policlonais da Bioreba para os vírus PLRV, PVX, PVY e PVS para a diagnose desses vírus.

Os tampões utilizados foram: tampão de cobertura (carbonato e bicarbonato 0,025M, pH 9,6, contendo 0,02 g/l de azida sódica); tampão de extração do vírus (Tris-HCl pH 7,4, contendo 0,8% de NaCl; 2% de PVP, 0,02% de KCl e 0,02% de azida sódica); tampão do conjugado (Tris-HCl, pH 7,4, contendo 0,8% de NaCl, 2% de PVP, 0,2% de BSA, 0,02% de MgCl₂, 0,02% de KCl, 0,02% de azida sódica, 0,05% de Tween – 20); tampão do substrato (dietanolamina pH 9,8) e tampão de lavagem (solução salina tamponada (PBS) contendo 0,05% de Tween – 20). As diluições dos anti-soros seguiram as instruções do fabricante.

Foram utilizadas as microplacas padrão de poliestireno, marca Nunc, com 96 orifícios. As leituras foram realizadas entre 30 e 60 minutos após a adição final do substrato, a 405nm no espectrofotômetro MRX (Dynatech). Foram consideradas positivas amostras cujas absorbâncias foram iguais ou superiores a duas vezes a média da absorbância do controle sadio.

2.5 Caracterização molecular

Foi estudado o fragmento genômico correspondente à região da capa protéica do PVS, fazendo a sua amplificação por RT-PCR e posterior seqüenciamento dos nucleotídeos.

2.5.1 Extração do RNA total

Para se extrair o RNA total, o protocolo seguido foi o do método de Trizol (AFGC Protocols, 2002), em que folhas jovens, infectadas (1g), foram maceradas em almofariz na presença de nitrogênio líquido e, ao pó obtido, foram adicionados 5mL da solução de Trizol (380 mL/L de fenol insaturado; 118,16g de guanidina tiocianato, 0,8M; 76,12g de amônia tiocianato, 0,4M; acetato de sódio 33,4mL, 01M; glicerol 50mL e água ultrapura). Em seguida, os tubos foram incubados em banho-maria, por 5 minutos, a 60°C e centrifugados a 12.000 rpm por 10 minutos, a 4°C. O pellet foi descartado, o sobrenadante transferido para outro tubo e adicionados 300µL de clorofórmio em cada tubo. Após agitação em vórtex, permaneceram em temperatura ambiente por 3 minutos. Para finalizar a separação das fases, os tubos foram centrifugados a 12.000 rpm, por 10 minutos, a 4°C. A fase aquosa foi cuidadosamente coletada e transferida para outro tubo, adicionando-se isopropanol e 0,8M de citrato de sódio/1,2M de NaCl, na quantidade de ½ do volume da fase aquosa. Misturou-se gentilmente por inversão e deixou-se à temperatura ambiente por 10 minutos, para a precipitação do RNA. Em seguida, centrifugou-se, a 12.000 rpm, por 10 minutos, a 4°C, descartou-se o sobrenadante e fez-se a lavagem do precipitado com 300µL de etanol 70%. O pellet foi secado a vácuo por 2 minutos e ressuspenso em 25µL de água ultrapura tratada com dietilpirocarbonato (DEPC). O RNA foi analisado por eletroforese em gel de agarose 0,7%, antes de ser empregado no teste de RT-PCR.

Os *primers* utilizados para o PVS^O foram desenhados com base nos isolados disponíveis no GenBank, visando amplificar a região da capa protéica, enquanto que, para o PVS^A, os *primers* empregados foram os descritos por Boohmam et al. (2003), também para a capa protéica de isolados Andinos. As seqüências e os tamanhos dos fragmentos amplificados estão apresentados na Tabela 3.

TABELA 3. *Primers* usados para amplificar o gene da capa protéica do *Potato virus S*, estirpes PVS^O e PVS^A.

Vírus	Primer	Seqüência (5' - 3')	Amplificação (pb)
PVS ^O	Forward	CTGGATCCATGCCGCCTAAACC	908
PVS ^O	Reverse	CTAAACGGTCTGCCTTCAT	
PVS ^A	Forward	GAATATACAGTCTCACAGCAAGAA	949
PVS ^A	Reverse	CCTGTAAACACACAACAGTAACAT	

2.5.2 Transcrição reversa (RT)

Para a obtenção do cDNA foi feita a reação de transcrição reversa utilizando-se 0,8µL da enzima AMV-RT, 2µL de AMV-RT buffer 10X, 4µL de MgCl₂ – 25mM, 2µL de dNTP mix 10mM, 0,5µL de RNAsin, 1µL do *primer* reverse, 4,7 µL de *nuclease free water* e, finalmente, 5µL do RNA total. Os tubos foram incubados, por 60 minutos a 42°C, 5 minutos a 95°C e imediatamente transferidos para um recipiente com gelo.

2.5.3 Reação da polimerase em cadeia (PCR)

Na PCR realizada para cada isolado de PVS estudado foram utilizados: 14,5µL de água ultrapura tratada com DEPC, 5,0µL de 5X PCR Buffer, 1,5µL de MgCl₂ – 25mM, 0,5µL de dNTP mix 10mM, 1,25µL do primer sense, 1,25µL do primer anti-sense, 0,5µL da enzima Go Taq DNA polimerase para 0,5µL de cDNA. Foram empregados 30 ciclos, sendo 94°C por 40 segundos, 53°C por 55 segundos e 72°C por 2 minutos, com extensão final a 72°C por 5 minutos. Os produtos foram analisados por eletroforese em gel de agarose (0,7%).

2.5.4 Seqüenciamento e análise das seqüências

O DNA amplificado para cada um dos 10 isolados foi purificado diretamente do gel de agarose, utilizando-se o kit de purificação “GFX PCR DNA and Gel Band Purification KIT” da empresa Biosciences. O protocolo foi o recomendado pelo fabricante.

O seqüenciamento foi feito no laboratório da Embrapa de Sete Lagoas. As seqüências oriundas dos cromatogramas foram analisadas pelo Programa BLAST. A comparação com outros isolados de PVS^A e PVS^O foi feita utilizando-se 16 das diversas seqüências do genoma do PVS disponíveis no “GenBank” e um outro isolado do Brasil, o IDA.R seqüenciado por Barrocas et al. (2005b) (Tabela 4). Os alinhamentos múltiplos das seqüências de nucleotídeos e de aminoácidos foram feitos no programa CLUSTALW e as árvores filogenéticas obtidas no programa MEGA 2.1 com bootstrap, considerando valores superiores de 2.000 repetições.

TABELA 4. Relação dos isolados de *Potato virus S* (PVS) disponíveis no GenBank (NCBI, 2007), empregados para comparação das seqüências genéticas com as seqüências dos isolados estudados.

Acesso	Origem	Estirpe	Autores/publicação
AF493950	Inglaterra	PVS ^O	Boonham et al. (2003)
AF493951	Inglaterra	PVS ^A	Boonham et al. (2003)
AJ863509	Rep. Tcheca	PVS ^O	Matousek et al. (2005)
AJ863510	Rep. Tcheca	PVS ^A	Matousek et al. (Não publicado)
AJ889246	China	PVS ^O	Shi et al. (Não publicado)
AY512653	China	PVS ^O	Chen & Du (Não publicado)
D00461	Canadá	PVS ^A	Mackenzie et al. (1989)
DQ315387	China	PVS ^O	Wu et al. (Não publicado)
DQ786653	India	PVS ^O	Gawande et al. (Não publicado)
S45593	Inglaterra	PVS ^O	Foster & Mills (1992)
U74375	Coréia do Sul	PVS ^O	Joung (Não publicado)
U74376	Coréia do Sul	PVS ^O	Joung (Não publicado)
Y15609	Rep. Tcheca	PVS ^O	Matousek et al. (2000)
Y15611	Rep. Tcheca	PVS ^O	Matousek et al. (2000)
Y15625	Rep. Tcheca	PVS ^O	Matousek et al. (2000)
AY687337	China	PVS ^O	Lang et al. (Não publicado)
IDA.R	Brasil	PVS ^O	Barrocas et al. (2005b)

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Propriedades biológicas dos isolados de PVS

Os sintomas induzidos pelos isolados estudados estão discriminados na Tabela 5. Apenas três das espécies utilizadas apresentaram sintomas quando inoculadas com os isolados de PVS: *C. quinoa*, *C. amaranticolor* e *Lycopersicon esculentum*. As duas primeiras apresentaram lesões locais cloróticas, para todos os isolados, com início do aparecimento aos 15 dias após a inoculação na época A, ou seja, no inverno e 10 dias após a inoculação na época B (verão de 2007). Apesar de os sintomas aparecerem primeiro na época B, eles foram mais nítidos na época A, do mesmo modo que o relatado por Hiruki (1974) e por Borkx & Piron (1978) que também observaram sintomas mais fortes sob temperaturas mais baixas.

A única exceção ocorreu com o isolado BB-AND que, além dos sintomas de lesão local, induziu também sintomas sistêmicos em plantas de *C. quinoa* (Tabela 5 e Figura 1), 20 a 30 dias após a inoculação. As plantas de *Chenopodium amaranticolor* reagiram apenas com lesões locais, até o final do ciclo, quando infectadas com esse isolado. O sintoma sistêmico, causado por isolados de PVS em plantas de *C. quinoa*, foi primeiramente relatado por Hinostroza-Orihuela (1973) para um isolado encontrado no Peru e, depois, por diversos outros pesquisadores de diversos outros países e continentes (Slack, 1981; Rose, 1983; Slack, 1983; Dolby & Jones, 1987; Wardrop et al., 1989; Weidemann & Koenig, 1990; Foster et al., 1990; Foster, 1991; Foster & Mills, 1991; Foster, 1992; Foster & Mills, 1992; Fletcher, 1996; Garg et al., 2000; Matousek et al., 2004). Todos os isolados com essa característica foram, então, denominados de estirpe Andina ou PVS^A. Como a sua transmissibilidade pelo vetor ficou posteriormente comprovada, ao contrário do que acontece com a

estirpe PVS^O, essa também passou a ser uma das características empregadas para a diferenciação das duas estirpes.

Confirmando resultados obtidos por Barrocas et al. (2005a), as plantas de tomate inoculadas com os isolados SJ-CAL e SJ-CHI apresentaram também anéis arroxeados na face inferior das folhas.

A confirmação da presença do PVS, nas plantas com sintomas, foi feita por retroinoculação em plantas sadias e pelo teste sorológico DAS-ELISA. Segundo Edwardson (1984), algumas estirpes do vírus Y, quando inoculadas em plantas de *C. quinoa*, podem causar lesões cloróticas locais nas folhas. Para evitar esse tipo de confusão, além do teste sorológico, foram também inoculadas plantas que são indicadoras para os outros vírus mais comuns em batata, como *Gomphrena globosa* para o PVX, *Nicotiana tabacum* cv. TurkishNN (TNN) para o PVY e *Phaseolus vulgaris* para o PVM (Hiruki, 1970; German, 2001).

TABELA 5. Sintomas apresentados por dez espécies de plantas inoculadas mecanicamente com dez isolados do *Potato virus S* (PVS), em duas épocas: época A, de julho até agosto de 2006, e B, de fevereiro a abril de 2007.

Espécies inoculadas	Isolados de PVS																			
	SJ-CAL		SJ-CHR		SJ-CHI		SJ-ATL		SM-AST		BB-AND		PE-SHE		RS-BAR		AL-VIV		SJ-AST	
	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
<i>Alternanthera tenella</i>	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS
<i>Amaranthus viridis</i>	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS
<i>Capsicum annum</i>	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS
<i>Chenopodium amaranticolor</i>	LL	LL	LL	LL	LL	LL	LL	LL	LL	LL	LL	LL	LL	LL	LL	LL	LL	LL	LL	LL
<i>Chenopodium quinoa</i>	LL	LL	LL	LL	LL	LL	LL	LL	LL	LL	IS	IS	LL	LL	LL	LL	LL	LL	LL	LL
<i>Datura stramonium</i>	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS
<i>Gomphrena globosa</i>	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS
<i>Lycopersicon esculentum</i>	AA	AA	SS	SS	AA	AA	SS	SS												
<i>Nicotiana rustica</i>	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS
<i>Nicotiana tabacum</i>	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS

LL = lesão local clorótica; IS = infecção sistêmica; SS = sem sintomas; AA = anéis arroxeados.

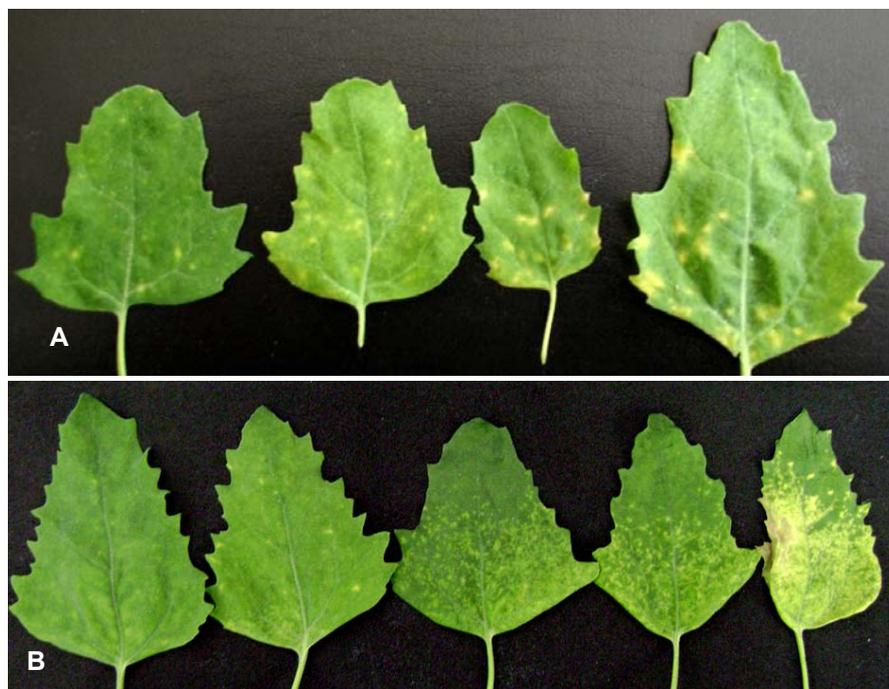


FIGURA 1. Evolução do sintoma de lesão local clorótica provocado pelos isolados do *Potato virus S* - PVS^O (A) e do sintoma de infecção sistêmica induzida pelo isolado BB-AND (B) em plantas de *Chenopodium quinoa*.

3.2. Transmissão do isolado BB-AND pelo vetor

Os testes de transmissibilidade pelo vetor *Myzus persicae* foram realizados devido ao aparecimento de sintoma sistêmico em plantas de *C. quinoa* infectadas com o isolado BB-AND, sintoma esse característico da estirpe PVS^A.

Resultados preliminares indicaram a transmissão do vírus para 5 das 44 plantas de *C. quinoa* inoculadas pelo vetor; em 4 plantas que apresentaram sintomas, o vetor alimentou-se por 24 horas. Slack (1981) conseguiu transmissão do vírus em 3 das 23 plantas de *C. quinoa* inoculadas com o vetor *Myzus persicae*. Weidemann & Koenig (1990) observaram que a transmissão

pelo *Myzus persicae* de isolados da estirpe Andina do PVS não é uniforme, pois as taxas de transmissão obtidas por eles foram de 2,4% e 8,5% em plantas de *C. quinoa* inoculadas com um isolado oriundo da Alemanha e outro proveniente da região dos Andes, respectivamente. Wardrop et al. (1989) testaram, além do *Myzus persicae*, várias espécies de afídeos, como *Aphis nasturtii*, *Macrosiphum euphorbiae*, *Aulocarthum solani* e *Rhopalosiphum padi*, na tentativa de se transmitir o PVS^A de batata para batata e de batata para *Nicotiana debneyi*. Como resultado, o *Myzus persicae* infectou 5,9% das plantas de batata e o *Aphis nasturtii* 14,3%, sob condições de laboratório. Nenhuma das espécies de afídeos testadas transmitiu o PVS^A de batata para *N. debneyi*.

A presença do vírus nas plantas inoculadas pelo vetor foi confirmada pelo teste DAS-ELISA e por retro inoculação em plantas sadias. Os testes de inoculação nas plantas de batata ainda se encontram em andamento e os resultados ainda não são conclusivos. Entretanto, os resultados obtidos com *C. quinoa* são evidências seguras de que essa estirpe é também transmissível pelo *Myzus persicae*.

3.3 Caracterização molecular dos isolados de PVS

O par de *primers* desenhados, com base nas seqüências dos isolados do PVS^O, permitiu a amplificação de um fragmento de 908pb, abrangendo os 882pb (294 aminoácidos), referentes à região da capa protéica de nove isolados (Figura 2). Apenas o BB-AND não pode ser amplificado com esse par de *primers*, mas sim com os *primers* desenhados por Boonham et al. (2003) para as estirpes Andinas, que possibilitaram a obtenção de um fragmento de 949pb, contendo os 885pb (295 aminoácidos) da capa protéica (Figura 2).

O alinhamento múltiplo das seqüências de nucleotídeos dos dez isolados e entre eles e os disponíveis no banco de genes, pode ser observado na Figura 3A e na Tabela 6.

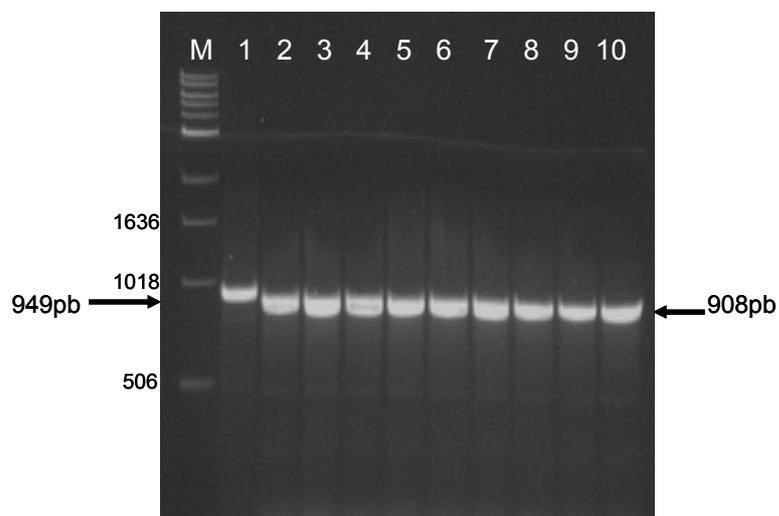


FIGURA 2. Análise eletroforética em gel de agarose dos produtos de PCR. M=1Kb DNA ladder; 1-BB-AND, banda obtida com os primers desenhados para PVS^A; de 2 a 10 bandas obtidas com os pares de primers desenhados para o *Potato virus S*, isolado PVS^O sendo: 2-SJ-CAL; 3-SJ-CHR; 4-SJ-CHI; 5-SJ-ATL; 6-SM-AST; 7-PE-SHE; 8-RS-BAR; 9-AL-VIV e 10-SJ-AST.

A identidade entre os isolados brasileiros variou de 75% (BB-AND e RS-BAR) a 98% (PE-SHE e SJ-ATL, SJ-AST, SJ-CHR, entre SJ-CHR e SJ-CHI e entre SJ-ATL e SJ-AST). Quando comparados aos outros isolados do GenBank, a identidade mínima dos isolados brasileiros foi de 76% (entre o isolado BB-AND e AJ863509, S45593 e U74376), a máxima foi de 98% entre o isolado AL-VIV e outros 4 do GenBank (AF493950, AY512653, Y15609 e Y15611). A identidade máxima entre o isolado BB-AND e os disponíveis no GenBank foi de 85% com os isolados D00461(do Canadá) e AJ863510 (da República Tcheca). No alinhamento das seqüências de nucleotídeos dos

isolados disponíveis no GenBank esses dois isolados apresentaram a maior identidade, ou seja, 100%, indicando uma alta probabilidade de terem mesma origem geográfica. A menor identidade foi de 80%, entre os isolados da Inglaterra AF493950 e AF493951 e entre S45593 (China) e AF493951(Inglaterra), AJ863510 (Inglaterra) e o D00461(Canadá).

A maior identidade de aminoácidos (Tabela 7 e Figura 4A) entre os dez isolados brasileiros foi de 98%, entre os isolados PE-SHE, SJ-AST, SJ-ATL, SJ-CHI e SJ-CHR, entre os isolados SJ-AST, SJ-ATL e SJ-CHI e entre os isolados SJ-ATL, SJ-CHI e SJ-CHR. A menor identidade foi de 83%, entre os isolados BB-AND, SJ-CAL e RS-BAR. Entre os isolados brasileiros e os do GenBank, a identidade mínima foi de 83%, entre o BB-AND e o AY512653, da China, enquanto que a máxima foi de 99%, entre os isolados AL-VIV e Y15611 da República Tcheca. A máxima identidade de aminoácidos do BB-AND com os isolados do GenBank foi de 88%, também com os isolados AJ863510, da República Tcheca e D00461 do Canadá, que tiveram uma identidade de 100% entre si. A menor identidade entre os isolados do GenBank foi de 91%, entre o U74376 e AF493951 e o AJ863510 e entre o AJ863510 e o S45593.

Na árvore filogenética (Figura 3) baseada na seqüência de nucleotídeos dos dez isolados brasileiros e dos demais isolados disponíveis no GenBank, pode-se verificar que os isolados SJ-AST, PE-SHE, SJ-ATL, SJ-CHR, SJ-CHI, do Brasil e o U74375, da Coréia do Sul, ficaram juntos, próximos ao agrupamento formado pelo SJ-CAL, RS-BAR e SM-AST. Os isolados mais próximos a eles foram AJ889246 da China e o Y15625 da República Tcheca. O isolado IDA.R se alocou separadamente, juntamente com o isolado DQ786653, da Índia. O mesmo aconteceu com o AL-VIV, que se agrupou com isolados da República Tcheca, da Inglaterra e da China. O isolado BB-AND se agrupou separadamente dos demais PVS^O, com outros dois isolados de PVS^A, o

AJ863510 da República Tcheca e o D00461 do Canadá. Mesmo assim, foi bastante diferente desses dois, ficando em um braço separado no agrupamento.

Na árvore filogenética baseada na seqüência de aminoácidos (Figura 4), a maioria dos isolados brasileiros (SJ-CHR, SJ-ATL, SJ-CHI, SJ-AST, PE-SHE e RS-BAR) novamente ficou num grupamento próximo, juntamente com o U74375 e o U74376, da Coréia do Sul. O SJ-CAL se agrupou com os isolados S455593, da Inglaterra e o DQ315287, da China. O outro isolado brasileiro, IDA.R, se agrupou com o AF493950 da Inglaterra e o AY687337 da China. O AL-VIV e o SM-AST ficaram em outro grupamento, juntamente com isolados da China e República Tcheca. A distância entre o BB-AND e os demais isolados foi bem maior, quando se considerou a seqüência de aminoácidos, com maior proximidade dos isolados Andinos AJ863510 e D00461, já citados. Esses e outros resultados biológicos e moleculares obtidos evidenciam que o BB-AND é uma estirpe do tipo PVS^A, com uma seqüência bastante diferente das outras estirpes Andinas disponíveis no GenBank. Esse isolado foi encontrado em uma geração de semente oriunda de tubérculos importados do Chile, entretanto, não existe nenhuma seqüência de PVS^A, proveniente dessa região, disponível no GenBank. Portanto, a origem desse isolado não pode ser comprovada.

TABELA 6. Porcentagem de identidade na seqüência de nucleotídeos do gene da capa protéica entre os dez isolados estudados em comparação com a seqüência de outros dezesseis isolados de *Potato virus S* (PVS) depositados no GenBank e um isolado do Brasil.

Isolados	PE-SHE	BB-AND	RS-BAR	SI-AST	SI-ATL	SI-CAL	SI-CHI	SI-CHR	IDA.R	SM-AST	AF493990	AF493951	AJ863509	AJ863510	AJ88246	AJ512653	D00461	DQ315387	DQ786653	S45593	U74375	U74376	Y15609	Y15611	Y15625	AY687337	
AL-VIV	96	76	94	96	96	94	95	95	94	95	98	81	97	80	94	98	80	95	92	94	95	94	98	98	96	97	
PE-SHE	-	77	96	98	98	96	98	98	94	94	96	81	95	81	95	96	81	95	92	94	97	94	95	95	95	95	
BB-AND	-	-	75	77	77	77	77	77	77	77	77	81	76	85	77	77	85	77	78	76	77	76	77	77	77	77	
RS-BAR	-	-	-	96	96	95	95	95	92	92	94	80	93	80	93	94	80	93	91	92	96	93	93	94	93	93	
SI-AST	-	-	-	-	98	96	97	97	94	94	96	81	95	80	95	95	80	95	92	94	97	94	95	95	95	94	
SI-ATL	-	-	-	-	-	96	97	97	94	94	95	81	95	81	95	95	81	95	92	94	97	94	95	95	95	94	
SI-CAL	-	-	-	-	-	-	95	95	93	92	94	81	93	81	93	94	81	94	91	93	95	93	94	94	94	93	
SI-CHI	-	-	-	-	-	-	-	98	93	93	95	81	94	80	94	95	80	94	92	93	96	93	94	94	94	93	
SI-CHR	-	-	-	-	-	-	-	-	93	93	95	81	94	80	94	95	80	94	92	93	96	93	94	94	94	94	
IDA.R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	92	94	80	93	79	93	94	79	95	91	93	93	92	94	93	93	93	
SM-AST	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	95	80	94	80	93	95	80	94	91	93	93	93	95	95	94	94	
AF493990	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	80	98	81	95	98	81	95	93	93	95	94	98	98	96	98	
AF493951	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	81	85	82	81	85	81	81	80	81	81	82	82	82	81	
AJ863509	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	81	94	98	81	95	93	94	95	94	97	97	95	96	
AJ863510	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	82	81	100	82	81	80	81	81	81	81	82	81	
AJ88246	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	95	82	95	93	94	94	93	94	94	95	94	
AJ512653	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	81	95	93	94	95	95	98	98	96	97	
D00461	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	82	81	80	81	81	81	81	81	82	81
DQ315387	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	93	94	94	94	95	95	95	94	
DQ786653	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	91	93	91	92	92	93	92	
S45593	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	94	93	94	94	93	93	
U74375	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	95	95	95	95	94	
U74376	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	95	94	95	93	
Y15609	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	98	96	96	
Y15611	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	96	97	
Y15625	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	95	

Tabela 7. Porcentagem de identidade na seqüência de aminoácidos do gene da capa protéica entre os dez isolados estudados em comparação com a seqüência de outros dezesseis isolados de *Potato virus S* (PVS) depositados no GenBank e um isolado do Brasil.

Isolados	PE-SHE	BB-AND	RS-BAR	SF-AST	SF-ATL	SF-CAL	SF-CHI	SF-CHR	IDA.R	SM-AST	AF493950	AF493951	AJ863509	AJ863510	AJ889246	AJ512653	D00461	DQ315387	DQ786653	S45593	U74375	U74376	Y15609	Y15611	Y15625	AY087337
AL-VIV	97	85	96	97	97	95	96	96	95	97	98	93	98	93	97	98	93	97	96	96	97	96	98	99	97	98
PE-SHE	-	85	96	98	98	96	98	98	95	96	98	93	96	93	97	96	94	97	96	96	98	95	97	97	97	97
BB-AND	-	-	83	85	85	83	84	86	84	85	85	86	85	88	86	83	88	85	85	84	85	84	86	85	85	85
RS-BAR	-	-	-	96	97	95	96	95	93	93	96	91	95	91	95	95	91	95	94	94	96	94	95	95	95	95
SF-AST	-	-	-	-	98	96	98	97	95	96	97	92	95	93	97	95	93	96	96	96	98	95	96	96	96	96
SF-ATL	-	-	-	-	-	97	98	98	95	95	97	93	96	93	97	96	93	97	96	96	98	95	96	97	96	97
SF-CAL	-	-	-	-	-	-	96	96	93	93	95	90	94	91	95	94	92	94	93	96	93	96	94	94	94	94
SF-CHI	-	-	-	-	-	-	-	95	95	97	92	95	93	96	95	93	96	95	95	95	97	94	96	96	96	96
SF-CHR	-	-	-	-	-	-	-	-	94	95	96	91	95	92	96	94	92	96	95	95	97	94	95	96	95	96
IDA.R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	94	96	91	94	91	95	94	91	95	93	94	95	93	95	95	94	95
SM-AST	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	96	92	95	92	95	96	92	96	94	95	95	94	97	97	95	96
AF493950	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	93	98	93	97	98	94	98	97	97	98	96	98	98	97	99
AF493951	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	92	94	94	92	94	93	93	92	93	91	93	93	94	93
AJ863509	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	92	96	97	92	97	95	95	97	95	97	98	97	97
AJ863510	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	94	93	100	93	93	91	93	91	93	93	94	93
AJ889246	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	96	95	97	96	96	97	94	96	97	96	97
AJ512653	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	93	97	95	95	97	95	98	98	97
D00461	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	93	93	93	93	92	94	93	94
DQ315387	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	96	96	97	95	97	97	96
DQ786653	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	94	96	94	96	96	96
S45593	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	96	94	96	96	95	96
U74375	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	96	97	97	97	97
U74376	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	96	96	95	95
Y15609	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	98	97	97
Y15611	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	97	98
Y15625	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	97

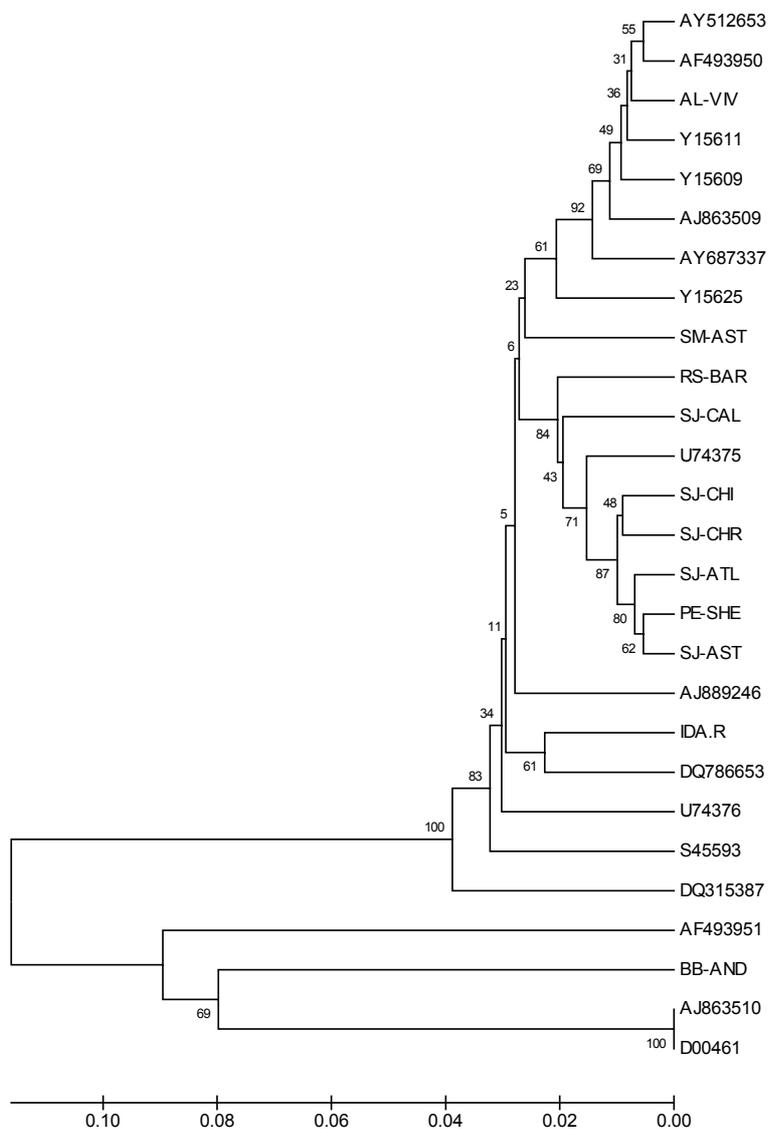


FIGURA 3. Árvore filogenética construída com base na seqüência de nucleotídeos do fragmento estudado. Os valores de bootstrap foram obtidos pelo programa MEGA e UPGMA, com 2.000 repetições.

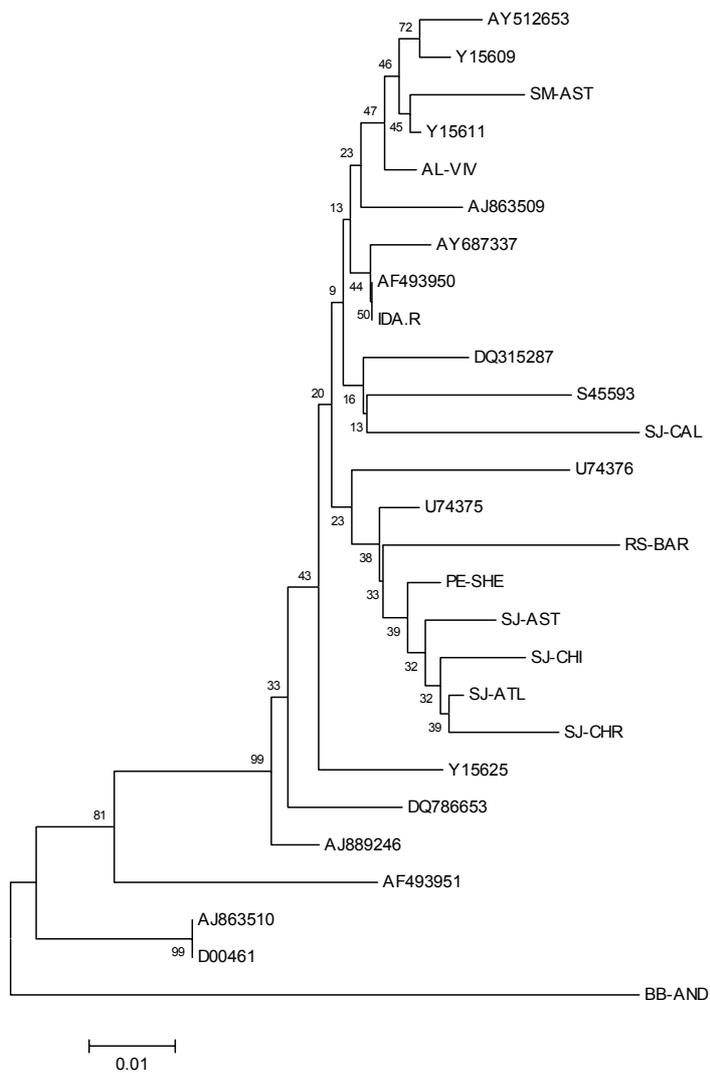


FIGURA 4. Árvore filogenética construída com base na seqüência de aminoácidos do fragmento estudado. Os valores de bootstrap foram obtidos pelo programa MEGA e Neighbor Joining, com 2.000 repetições.

Com exceção do isolado BB-AND, não parece haver correlação entre os sintomas induzidos pelos isolados de PVS na planta hospedeira e a identidade de nucleotídeos e ou aminoácidos da capa protéica, ou agrupamento nas árvores filogenéticas. Isso porque tanto o isolado SJ-CAL como o SJ-CHI e, ainda, o IDA.R induziram anéis arroxeados nas plantas de tomate, mas se agruparam em ramos diferentes, apesar de estarem em regiões próximas.

Foster & Mills (1991) analisaram diferentes isolados de PVS e observaram que a comparação entre a seqüência de aminoácidos da capa protéica e do gene 11kDa poderia diferenciá-los em duas estirpes, baseando-se na posição e na identidade dos aminoácidos. Esses autores verificaram que os isolados de PVS^O possuíam alto grau de identidade com os isolados de PVS^A, com valores compreendidos entre 93%, para o gene da capa protéica e 79%, para o gene 11kDa. A maior diferença foi na região N-terminal da capa protéica em um bloco de 11 aminoácidos e um bloco de 8 aminoácidos na proteína 11kDa. Esses blocos de aminoácidos são responsáveis pelas diferenças substanciais entre o PVS^O e PVS^A, provavelmente refletindo nos sintomas causados por elas e na transmissão por afídeos da estirpe Andina.

Matousek et al. (2000) encontraram resultados semelhantes, quando compararam a região da capa protéica de oito isolados de PVS, entre PVS^A e PVS^O. Os autores observaram 96,7% de homologia entre eles, tendo as maiores diferenças sido observadas também na capa protéica e na proteína 11kDa. Em adição, eles encontraram diferenças significativas na proteína 7kDa do bloco triplo que compõe a proteína de movimento.

Em outras comparações entre os genomas das duas estirpes de PVS^A, Matousek et al. (2004) fizeram a análise do genoma das duas estirpes de PVS, comum e andina, utilizando sondas de cDNA. Eles dividiram o genoma do PVS em onze zonas e desenharam *primers* específicos para cada uma delas, para empregar na técnica de “imunocapture RT-PCR”. Eles empregaram 23 isolados

de PVS, incluindo isolados oriundos da Alemanha e ainda os isolados Yuguima, Peruanita, Olívia e Blaue mandel, selecionados por causarem também sintoma sistêmico em *C. quinoa*. Eles observaram que os *primers* desenhados para o PVS^A não foram capazes de amplificar o genoma do PVS^O em diversas posições do genoma, mostrando significativa diferença entre eles. Finalmente, estudaram em detalhes um fragmento de 420nt da região da CP e demonstraram que existem diferenças em pontos específicos da porção 5' terminal da CP. Analisando a árvore filogenética, concluíram que os isolados andinos provavelmente são originários dos isolados comuns europeus e não dos isolados originais do Peru.

Neste trabalho, a estirpe andina encontrada (BB-AND) mostrou características distintas dos isolados da Europa e do Canadá, tanto em relação à identidade de nucleotídeos como no seu posicionamento nas árvores filogenéticas baseadas na identidade de aminoácidos e de nucleotídeos. Considerando-se a origem desse isolado, existe a possibilidade de ele ser semelhante ao isolado original descrito no Peru.

4 CONCLUSÕES

- 1- Os isolados de *Potato virus S*, SJ-CAL e SJ-CHI, induzem anéis arroxeados em plantas de tomate.
- 2- Nove dos isolados de PVS estudados induziram lesões locais cloróticas em plantas de *Chenopodium quinoa* e apresentaram identidade, entre si, de 93 a 98%, e entre eles e os isolados de PVS^O do GenBank, de 91 a 99% , indicando que devem pertencer a esse grupo.
- 3- O isolado BB-AND apresentou características biológicas e maior identidade com os isolados de PVS^A, se encaixando, portanto, dentro das características da estirpe Andina.
- 4- O isolado BB-AND por agrupar-se separadamente das estirpes Andinas disponíveis no GenBank, possivelmente tem outra origem geográfica.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AFGC. **Protocols**. 2002. Disponível em:
<<http://www.arabdopsis.org/portals/masc/AFGC/RevisedAFGC/site2RnaL.htm#isolation>>. Acesso em: 10 set. 2006.
- BARROCAS, N.E.; FIGUEIRA, A.R.; GALVINO, S.B.F.; PEREIRA, S.L.; FERRO, H.M. Análise molecular do gene da capa protéica de um isolado do vírus da batata (*Potato virus S* – PVS) no Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, v.30, p.S179, 2005b.
- BARROCAS, E.N.; FIGUEIRA, A.R.; GALVINO, S.B.F.; PEREIRA, S.L.; FERRO, H.M. Reação de plantas hospedeiras a isolados do vírus S da batata (*Potato virus S* – PVS). **Fitopatologia Brasileira**, v.30, p.S190. 2005a.
- BOKX, J.A.; PIRON, P.G.M. Detectability of *Potato virus S* in field-grown plants. **Medicine Fac. Landbouw Rijsuniv. Gent.**, Wargening, v.43, n.2, 1978.
- BOONHAM, N. et al. Detection of *Potato viruses* using microarray technology: towards a generic method for plant viral disease diagnosis. **Journal Virology Methods**, v.108, n.2, p.181-187, 2003.
- BYSTRICKA, D.; LENZ, O.; MRAZ, I.; PIHEROVA, D., KMOCH, S.; SIP, M. Oligonucleotide-based microarray: a new improvement in microarray detection of plant viruses. **Journal of Virological Methods**, v.128, p.176-182, 2005.
- CEROVSKA, N.; FILIGAROVA, M. Specific detection of Andean strain of *Potato virus S* by monoclonal antibodies. **Annual Applied Biology**, v.127, p.87-93, 1995.
- 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.
- DE BOKX, J.A.; PIRON, P.G.M. Detectability of *Potato virus S* in field-grown plants. **Medicine Fac. Landbouw Rijsuniv. Gent.**, Wargening, v.43, n.2, 1978.
- DOLBY, C.A.; JONES, R.A.C. Occurrence of the Andean strain of *Potato virus S* in imported potato material and its effects on potato cultivars. **Plant Pathology**, v.36, p.381-388, 1987.

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

FLETCHER, J.D. *Potato virus S^A* – Characteristics of an isolate from New Zealand. **New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science**, Christchurch, New Zealand, v.24, p.335-339, 1996.

FOSTER G.D.; MILLS, P.R. The 3'-nucleotide sequence of an ordinary strain of *Potato virus S*. **Virus Genes**, v.6, n.3, p.213-320, Aug. 1992.

FOSTER, G.D. Molecular variation between ordinary and Andean strain of *Potato virus S*. Mini-Review. **Research in Virology**, Paris, v.142, p.413-416, 1991.

FOSTER, G.D. The structure and expression of the genome of *Carlavirus*. Mini-review. **Research in Virology**, Paris, n.143, p.103-112, Feb. 1992.

FOSTER, G.D.; MILLS, P.R. Investigation of the 5' terminal structure of genomic and subgenomic RNAs of *Potato virus S*. **Virus Genes**, v.4, n.4, p-359-366, 1990.

FOSTER, G.D.; MILLS, P.R. Analysis of the coat proteins of the ordinary and Andean strains of *Potato virus S* and antigenic comparisons of *Carlavirus*. **Acta Virologica**, v.35, p.184-190, 1991.

GARG, I.D.; VINAYAK-HEGDE; HEGDE, V. Biological characterization, preservation and ultrastructural studies of Andean strain of *Potato virus S*. **Indian Phytopathology**, v.53, n.3, p.256-260, 2000. Abstract.

GERMAN, T.L. *Potato virus S*. In: STEVENSON, W.R. et al. (Ed.). **Compendium of potato diseases**. 2.ed. St Paul, 2001. p.67.

HINOSTROZA-ORIHUELA, A.M. Some proprieties of *Potato virus S* isolated from Peruvian potato varieties. **Potato Research**, v.16, p.244-250, 1973.

HIRUKI, C. Factors affecting bioassay of *Potato virus S* in *Chenopodium quinoa*. **Phytopathology**, v.65, p.1288-1292, 1974.

HIRUKI, C. Red Kidney Bean, a useful bioassay host for qualitative work with *Potato virus M*. **Phytopathology**, v.60, p.739-740, 1970.

MACKENZIE, D.J.; TREMAINE, J.H.; STACE-SMITH, R. Organization and intervirial homologies of the 3'-terminal portion of *Potato virus S* RNA. **Journal of General Virology**, v.70, p.1053-1063, 1989.

MATOUSEK, J.; PTACEK, J.; SCHUBERT, J.; KOZLOVA, P.; SKOPEK, J.; DEDIC, P. Molecular Probing of PVS genome by immocapture RT-PCR and by thermodynamic analysis In: EAPR VIROLOGY SECTION MEETING, 12., 2004, Rennes. **Abstracts...** Rennes, France: INRA, 2004. Poster 19, p.40.

MATOUSEK, J.; SHUBERT, J.; DEDIC, P.; PTACEK, J. Abroad variability of *Potato virus S* (PVS) revealed by analysis of virus sequences amplified by reverse transcriptase-polymerase chain reaction. **Canadian Journal of Plant Pathology**, v.22, p.29-37, 2000.

MATOUSEK, J.; SCHUBERT, J.; PTACEK, J.; KOZLOVA, DEDIC, P.; et al. Complete nucleotide sequence and molecular probing of *Potato virus S* genome. **Acta Virologica**, v.49, n.3, p.195-205, 2005.

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION (NCBI). **CoreNucleotide**. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=nucore> > Acesso em: 01 jul. 2007.

ROSE, D.G. Some properties of an unusual isolate of *Potato virus S*. **Potato Research**, v.26, p.49-62, 1983.

SLACK, S.A. Identification of an unusual strain of *Potato virus s* in North America. **Phytopathology**, v.71, n.255, 1981.

SLACK, S.A. Identification of an isolate of the Andean strain of *Potato virus s* in North America. **Plant Disease**, v.67, n.7, 1983.

WARDROP, E.A. Aphid transmission of *Potato virus S*. **American Potato Journal**, v.66, p.449-459, 1989.

WEIDEMANN, H.L.; KOENIG, R. Differentiation of isolates of *Potato virus S* which infect *Chenopodium quinoa* systemically by means of quantitative c DNA hybridization tests. **Zeitschrift-fur-Pflanzenschutz**, v.3, n.97, p.323-327, 1990.

WETTER, C. *Potato virus S.* Surrey, England: Commonw. Mycol. Inst.
/Assoc.Appl.Biol.,Kew., 1971. n.60. Disponível em: <www.dpvweb.net>. Acesso
em: 15 fev. 2007.

CAPÍTULO 3

EFEITO DO *Potato virus S* (PVS) NA PRODUÇÃO DE BATATA EM INFECCÕES SIMPLES E MISTAS

RESUMO

RIBEIRO, Silvia Regina Rodrigues de Paula. Efeito do *Potato Virus S* (PVS) na produção de Batata em infecções simples e mistas. In: _____. **Caracterização de isolados de *Potato virus S* (PVS) no Brasil e seu efeito na produção de batata.** 2007. Cap. 3, p.60-82. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.*

O fato de o PVS ser latente em planta de batata pode conduzir à falsa impressão de ser um vírus sem importância para a cultura. Sabe-se que ele pode induzir perdas maiores quando está associado a outros vírus, entretanto não existem trabalhos explorando essa possibilidade no Brasil. Por isso, nesse trabalho, plantas de batata cv. Ágata, infectadas apenas com o PVS e com infecções mistas foram plantadas para investigar o efeito na produção. Os tubérculos infectados, com as diferentes combinações de vírus, foram produzidos em casa de vegetação, por meio de inoculação com o vetor *Myzus persicae* para o PLRV e mecânica para os demais vírus. O experimento de campo foi conduzido na cidade de Maria da Fé, na fazenda experimental da EPAMIG, em blocos casualizados, empregando-se 40 planta por parcela com 4 repetições. Os tratamentos foram os seguintes: PVS, PVX e PVY; PVS + PVX, PVS + PVY, PVX + PVY e PVS + PVX + PVY (50% de incidência inicial); PLRV, PVS + PLRV, PVS + PLRV + PVX, PVS + PLRV + PVY; PVS + PLRV + PVX + PVY (15 % de incidência inicial). Nas parcelas em que se utilizou incidência de 50%, a maior perda foi de 37,03%, induzida pela infecção com PVS+PVX+PVY, e a menor foi de 15,01%, pela infecção simples com o PVX. Nas com 15% de incidência a menor perda foi induzida pela infecção simples com o PLRV (10,99%) e a maior pela infecção com os quatro vírus ao mesmo tempo (40,92%). De um modo geral, a maioria dos casos em que o PVS foi associado a um ou mais vírus nas plantas de batata, essas apresentaram sintomas mais intensos que os induzidos por cada vírus separadamente, mostrando que ele pode se tornar importante quando associado aos outros vírus que são freqüentes nos campos brasileiros de produção de batata.

* Orientadora: Antonia dos Reis Figueira – UFLA

* Co-Orientador: César Augusto Brasil Pereira Pinto – UFLA

ABSTRACT

RIBEIRO, Silvia Regina Rodrigues de Paula. Effect of the *Potato virus S* (PVS) on potato tuber yield in single and mixed infections. In: _____. **Characterization of the *Potato virus S* (PVS) strains in Brazil and effect on potato tuber yield.** 2007. Cap. 3, p.60-82 Thesis (Doctorate in Phytopathology) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.*

The *Potato virus S* (PVS) is often latent in potato plants, leading to the mistake that it could be a virus without importance for the crop. It is known that PVS can induce larger losses when associated with other viruses, however there are not so many studies about this subject in Brazil. In this work, potato plants cv. Agata, either infected only with PVS or in mixed infections, were planted to investigate the effect of virus infection on tuber yield. The infected tubers, with different virus combinations, were produced in greenhouse, through inoculation with the vector *Myzus persicae* for PLRV and mechanic inoculation for the other viruses. The field experiment was carried out in Maria da Fé- MG-Brazil, in the EPAMIG research station, in completely randomized blocks, using 40 plants per plot and 4 replications. The treatments were the following: PVS, PVX AND PVY; PVS + PVX, PVS + PVY, PVX + PVY and PVS + PVX + PVY (50% of initial incidence); PLRV, PVS + PLRV, PVS + PLRV + PVX, PVS + PLRV + PVY; PVS + PLRV + PVX + PVY (15% of initial incidence). In the plots with 50% of virus incidence, the largest loss was 37.03%, induced by the infection with PVS+PVX+PVY, and the smallest was 15.01%, for the single infection with PVX. In the plots with 15% of virus incidence the smallest loss was induced by the single infection with PLRV (10.99%) and the largest was with the infection with the four viruses at the same time (40.92%). In general, most of the cases in which PVS was associated with one or more viruses in the potato plants, those presented more intense symptoms than induced by each virus separately, showing that it can become important when associated with the other viruses which are frequent in the Brazilian potato production fields.

* Guidance Committee: Antonia dos Reis Figueira – UFLA (Adviser)
César Augusto Brasil Pereira Pinto – UFLA

1 INTRODUÇÃO

A cultura da batata é considerada de alto risco, devido às inúmeras pragas e doenças que podem contribuir para diminuir a sua produtividade. Essas doenças podem ser causadas por fungos, bactérias, nematóides e vírus, os quais podem ser veiculados pelas sementes, o que as torna um dos insumos mais caros e mais importantes para garantir o sucesso da cultura.

Dentre as doenças, as viróticas são as principais responsáveis pela degenerescência da batata, pois são de fácil disseminação e podem ser perpetuadas de geração para geração por meio dos tubérculos, que se tornam menos produtivos à medida que os vírus se multiplicam nos seus tecidos, causando a sua degenerescência (Silberschmidt, 1937).

No Brasil, o vírus do enrolamento (*Potato leafroll virus* ou PLRV) e posteriormente o vírus Y (*Potato virus Y* ou PVY) têm sido os principais causadores de perdas na cultura da batata. Isso porque, até recentemente, as importações de batata-semente foram feitas de países europeus, onde outros vírus como o *Potato virus X* (PVX) e o *Potato virus S* (PVS) também não são problema e as sementes eram isentas desses vírus. Entretanto, com a abertura da importação de batata-semente de outros países onde esses vírus ocorrem em alta incidência, eles passaram a ser detectados na batata-semente produzida no Brasil, causando até a condenação de campos de produção.

O problema maior é que como o PVS é um vírus latente e não é detectado visualmente na cultura, existe uma falsa crença de que a sua infecção não é associada a perdas. Sabe-se, porém, que eles podem causar perdas na produção em torno de 10% a 20%, dependendo da estirpe do vírus e da suscetibilidade da cultivar (Wetter, 1971; Bemmster & De Bokx, 1987). Entretanto, podem ocorrer perdas mais significativas em infecções mistas, quando a interação entre o PVS e outros vírus frequentes na cultura da batata

resulta em sintomas mais severos, com conseqüente diminuição da produção (German, 2001; Wright, 1970; Manzer et al., 1978; Marton et al., 1993). Assim sendo, a interação entre esse e outros vírus mais importantes merece atenção, pois, como o PVS não induz sintomas perceptíveis na grande maioria das cultivares de batata comerciais, pode passar despercebido nas inspeções visuais de campo.

O fato de o PVS praticamente não ter sido estudado no Brasil, aliado à importância de se determinar o seu efeito nas cultivares comerciais normalmente plantadas no país, faz com que os produtores brasileiros fiquem à mercê de idéias errôneas que os levam a negligenciar a sua verdadeira importância, quando presente na batata-semente a ser plantada. Este trabalho foi realizado com a finalidade de avaliar o efeito do PVS, quando presente em infecções simples e mistas, na produção de plantas de batata cv. Ágata.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Local

Parte dos experimentos foi conduzida na casa de vegetação e no Centro de Indexação de Vírus de Minas Gerais, localizados no Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Lavras. A parte que envolveu experimentos de campo foi conduzida na Fazenda Experimental da Epamig, no município de Maria da Fé, em Minas Gerais, localizada a 1.280m de altitude, 22°18'29" Sul de latitude e 45°22'32" Oeste de longitude.

2.2 Obtenção dos inóculos virais

Os vírus empregados como inóculo foram provenientes da coleção de vírus do Departamento de Fitopatologia da UFLA. Esses se encontram armazenados a -80°C, para serem multiplicados sempre que necessário. São eles:

- PVS – isolado da estirpe comum (PVS^O) mantido em plantas de *Chenopodium quinoa* e batata cv. Duvira, que é sempre analisada para se certificar se outros vírus se encontram ausentes;

- PVY – isolado da estirpe necrótica (PVY^N) mantido em folhas de fumo cv. Turkish NN (TNN);

- PVX – isolado mantido em folhas de *Gomphrena globosa*;

- PLRV – isolado mantido em plantas de *Datura stramonium* e *Physalis* sp., em condições de casa de vegetação, com repicagens periódicas com o pulgão *Myzus persicae*.

A confirmação da identidade do vírus é feita regularmente pelo teste DAS-ELISA.

2.3 Teste sorológico DAS-ELISA

O teste DAS-ELISA para a diagnose do PLRV, PVX, PVY e PVS foi feito utilizando-se os anti-soros policlonais da Bioreba, com o procedimento indicado pelo fabricante. As soluções tampões e de lavagem empregadas foram preparadas no laboratório: tampão de cobertura (carbonato e bicarbonato 0,025M, pH 9,6, contendo 0,02 g/l de azida sódica); tampão de extração do vírus (Tris-HCl pH 7,4, contendo 0,8% de NaCl; 2% de PVP, 0,02% de KCl e 0,02% de azida sódica); tampão do conjugado (Tris-HCl, pH 7,4, contendo 0,8% de NaCl, 2% de PVP, 0,2% de BSA, 0,02% de MgCl₂, 0,02% de KCl, 0,02% de azida sódica, 0,05% de Tween – 20); tampão do substrato (dietanolamina pH 9,8) e tampão de lavagem (solução salina tamponada (PBS) contendo 0,05% de Tween – 20). As leituras finais foram realizadas a 405nm, no espectrofotômetro MRX (Dynatech), tendo sido consideradas positivas as amostras cujas absorbâncias foram iguais ou superiores a duas vezes a média da absorbância do controle sadio.

2.4 Produção dos tubérculos com infecções simples e mistas

A inoculação dos tubérculos com um ou mais vírus foi feita por inoculação mecânica (PVY, PVX e PVS) e por meio do vetor ou por enxertia de hastes (PLRV), em condições de casa de vegetação. Foram produzidos tubérculos com infecções simples: PVS, PVX, PVY e PLRV; infecções duplas: PVS + PVX, PVS + PVY, PVX + PVY e PVS + PLRV; infecções triplas: PVS + PVX + PVY, PVS + PLRV + PVX, PVS + PLRV + PVY e infecções quádruplas: PVS + PLRV + PVX + PVY. À medida que as plantas com infecções mistas foram obtidas, foram também fotografadas para registro e divulgação dos sintomas.

Tubérculos de batata cv. Ágata, comprovadamente sadios, foram submetidos ao tratamento com bissulfureto de carbono (25ml/m³), por 72 horas,

para forçar a brotação. Depois da emergência dos brotos, os tubérculos foram plantados em vasos com capacidade de 5kg, contendo como substrato terra esterilizada, areia e esterco, na proporção 3:1:1. Após a emergência, as plantas foram inoculadas com cada um dos vírus desejados para a produção dos tubérculos.

A inoculação mecânica foi feita por fricção do extrato obtido por trituração de 1g de folhas infectadas com o vírus desejado em almofariz esterilizado, na presença 5 mL de tampão fosfato 0,01M, pH 7,0, contendo sulfito de sódio na mesma molaridade, nas folhas das plantas previamente pulverizadas com carborundum. Em seguida, as folhas foram lavadas com água e as plantas mantidas em casa de vegetação durante todo o ciclo da planta.

Na inoculação por vetor, os pulgões, criados em plantas saudas, foram transferidos para plantas de *D. stramonium* e ou *Physalis* sp. infectadas com o PLRV, para aquisição do vírus, por um período de 24 horas. Após esse período, eles foram transferidos para plantas saudas da cultivar Ágata, onde ficaram por mais 24 horas para transmitir o vírus. Após esse período, os pulgões foram eliminados com inseticida e as plantas colocadas em casa de vegetação, onde permaneceram até o final do ciclo. Em alguns casos, quando a inoculação com o vetor não foi eficiente, foi feita a enxertia de hastes de outra planta de batata infectada com o PLRV, para a transmissão do vírus.

Na primeira geração foram produzidas as interações simples e duplas e, na segunda geração, as infecções triplas e quádruplas. Nas infecções duplas, na primeira semana foi inoculado o primeiro vírus e na segunda semana o segundo vírus. A infecção das plantas foi confirmada pelo teste DAS-ELISA e por inoculação em plantas indicadoras. Na segunda geração, as plantas com infecção dupla da geração anterior foram inoculadas com o terceiro vírus e, no caso das infecções quádruplas, com o quarto vírus uma semana depois.

Após a obtenção dos tubérculos com as infecções desejadas, eles foram empregados para o experimento de campo.

2.5 Avaliação dos vírus na produção de batata cv. Ágata em condições de campo

Para a avaliação de produção, foram conduzidos ensaios na Fazenda Experimental da Epamig, na cidade de Maria da Fé, MG, no período de 21 de março a 7 de julho de 2007.

O delineamento experimental utilizado foi o de blocos casualizados com 13 tratamentos e 4 repetições. Os tratamentos empregados foram: T₁ – PVS; T₂ – PVX; T₃ – PVY; T₄ – PVS + PVX; T₅ – PVS + PVY; T₆ – PVS + PVX + PVY; T₇ – PVX + PVY; T₈ – PLRV; T₉ – PVS + PLRV; T₁₀ – PVS + PLRV + PVX; T₁₁ – PVS + PLRV + PVY; T₁₂ – PVS + PLRV + PVX + PVY; T₁₃ – SADIA. Cada parcela foi constituída por 40 tubérculos distribuídos em duas linhas, com espaçamento de 0,30m entre tubérculos e 0,80m entre linhas.

As incidências de vírus empregadas foram de 50% (T₁ ao T₇) e 15% (T₈ ao T₁₂).

A adubação de plantio foi feita com a formulação 4-14-8 (N, P₂O₅ e K₂O) na dosagem de 2,0 t/ha. No sulco do plantio foram pulverizados o fungicida Monscerem 250SC, na dosagem de 5L/ha e o inseticida Confidor 700G, na dosagem de 300g/ha. Cerca de 30 a 40 dias após o plantio realizou-se a adubação nitrogenada em cobertura, com 450kg/ha de sulfato de amônio, seguida da operação de amontoa. Durante a condução do ensaio, foram realizados os tratos culturais e fitossanitários normalmente empregados na cultura para impedir a competição de plantas invasoras e danos por pragas e doenças.

Avaliaram-se os seguintes caracteres: produção e classificação dos tubérculos por tamanho (miúdos – menores que 28mm, médios - menores que

45mm e maiores que 28mm e grãos – maiores que 45mm) número e peso. Foi considerada produção comercial a soma do peso dos tubérculos grãos e médios.

2.7 Análises estatísticas

Devido à irregularidade do estande, foi feita análise de covariância, pois essa torna-se uma grande fonte de variação nos experimentos de campo, acarretando o aumento do coeficiente de variação e, conseqüentemente, afetando a precisão experimental. O modelo estatístico usado para a análise foi o seguinte:

$$Y_{ij} = m + t_i + r_j + b(x_{ij} - \bar{x}) + e_{ij}'$$

em que:

Y_{ij} : é a produção total, variável dependente, obtida no tratamento i , repetição j ;

t_i : é o efeito do tratamento i ($i = 1, 2, 3 \dots 13$);

r_j : é o efeito da repetição j ($j = 1, 2, 3$ e 4);

b : é o coeficiente de regressão linear entre x e y ;

x_{ij} : é o número de plantas, variável independente, obtida no tratamento i repetição j ;

\bar{x} : é a média da variável independente \bar{x} ;

e_{ij}' : é o erro experimental.

Após estimados os valores de “ b ”, foi feito o ajuste de cada parcela com base no estande inicial, seguindo a metodologia proposta por Vencovsky & Barriga (1992), citados por Ramalho et al. (2005). A correção para o estande inicial foi feita usando-se a expressão:

$$\hat{y}_{ij} = y_{ij} - b(x_{ij} - N)$$

em que:

\hat{y}_{ij} : é a produção total (kg/ha) ajustada, obtida no tratamento i , repetição j .

y_{ij} : é a produção total (kg/ha), variável dependente, obtida no tratamento i , repetição j .

b : é o coeficiente de regressão linear entre x e y .

x_{ij} : é o número de plantas, variável independente, obtida no tratamento i bloco j .

N : é o valor do estande inicial.

Posteriormente, foi efetuada a análise de variância com os valores ajustados e o teste de média de Scott-Knott, utilizando-se o programa computacional Sisvar[®].

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Sintomas provocados pelo PVS em infecções simples e mistas em casa de vegetação

Os sintomas nas plantas de batata cv. Ágata, em infecções simples, estão apresentados na Figura 1. Comparando-se com as folhas de uma planta sadia (1-A) nota-se que as plantas infectadas apenas com o PVX (1-C) e o PVS (1-E) praticamente não mostraram sintomas, apresentando apenas um mosaico bem leve. Os sintomas induzidos pelo PVY (1-D), sozinho, se caracterizam por mosaico, aprofundamento das nervuras e diminuição da área foliar. Os induzidos pelo PLRV (1-B) são o enrolamento das margens dos folíolos para cima, a deformação foliar e o leve encarquilhamento.

Por outro lado, a interação entre o PVS e os outros vírus intensificou os sintomas, tornando-os mais evidentes. Isso pode ser visto na Figura 2, nas interações duplas do PVS com o PVY (2-A1), com o PVX (2-B1) e com o PLRV (2-C1). Na associação do PVY+PVX (Figura 2-D1), notou-se mosaico mais intenso, diminuição da área foliar e, ainda, enrugamento dos folíolos. Uma das características marcantes foi a diminuição do tamanho das plantas, que ocorreu de forma mais intensa nas associações entre PVS+PVY (2-A), PVS+PLRV (2-C) e PVX+PVY (2-D) em relação à planta sadia (2-E).

Nas interações triplas (Figura 3), no caso do PVS + PVX + PVY (3-A1) ocorreu o enrugamento severo, mosaico intenso, deformação e diminuição da área foliar, aprofundamento das nervuras e o encarquilhamento das folhas (Figura 3-A). A associação PVS+PVY+PLRV, além de induzir sintomas foliares (3-C1), como enrolamento acentuado das margens, mosaico severo, deformação e aprofundamento das nervuras, induziu também a redução no tamanho das plantas (Figura 3-C). Na Figura 3-B destaca-se uma planta com a interação entre PVS + PVX + PLRV e, nas folhas, nota-se mosaico intenso, deformação e,

ainda, diminuição da área foliar (3-B1). Finalmente, a infecção com os quatro vírus (Figura 4) fez com que o tamanho das plantas fosse bastante afetado (4-A). Esta apresentou ainda encarquilhamento, mosaico severo, enrugamento, embolhamento, deformação foliar e aprofundamento das nervuras (detalhe 4-B).

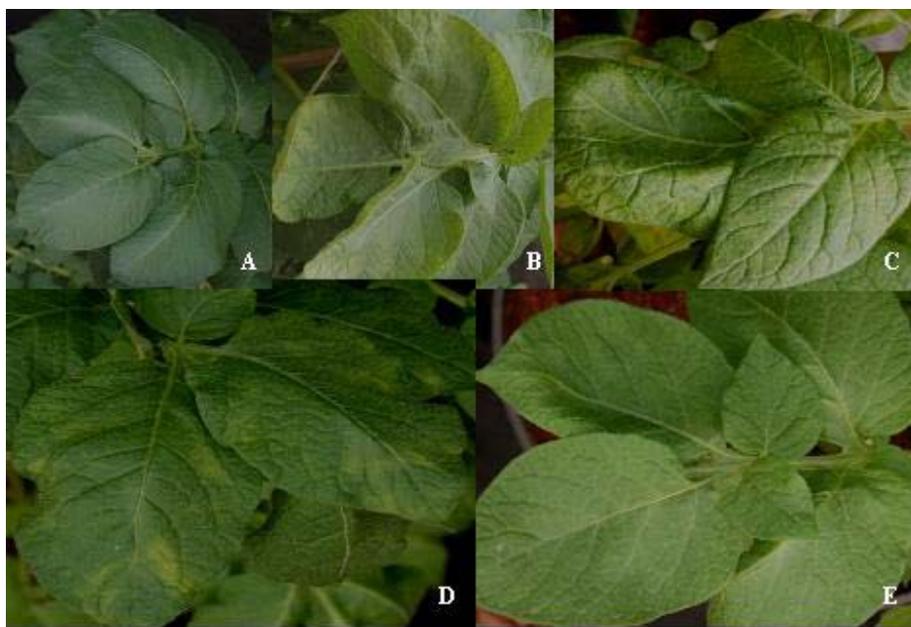


FIGURA 1. Folhas de batata cv. Ágata infectada com os vírus. A - Sadia; B - PLRV; C - PVX; D - PVY; E - PVS.

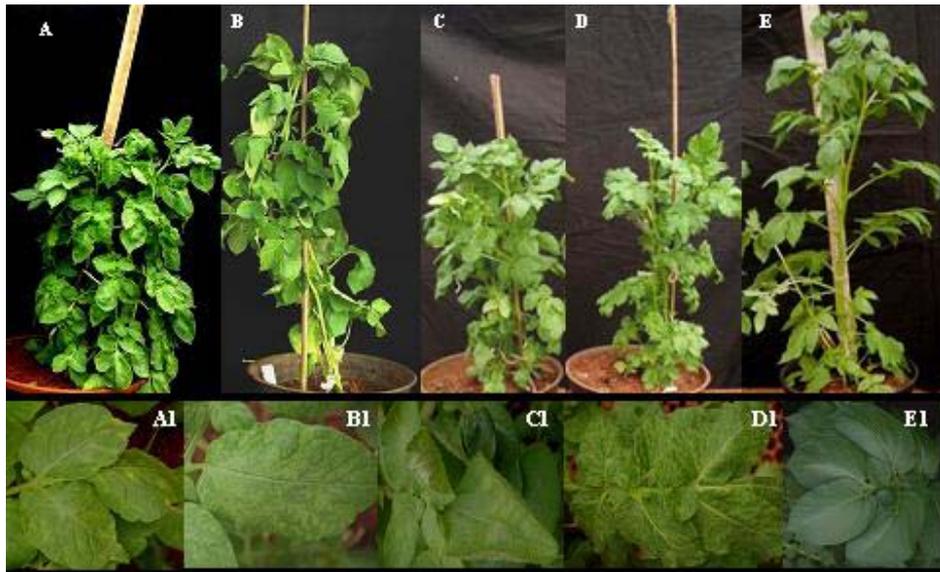


FIGURA 2. Plantas de batata cv. Ágata infectadas com os vírus. A- PVS + PVY; B- PVS + PVX; C- PVS+PLRV; D- PVX + PVY; E- Sadia. A1, B1, C1, D1 e E1 - detalhes nas folhas das respectivas plantas.

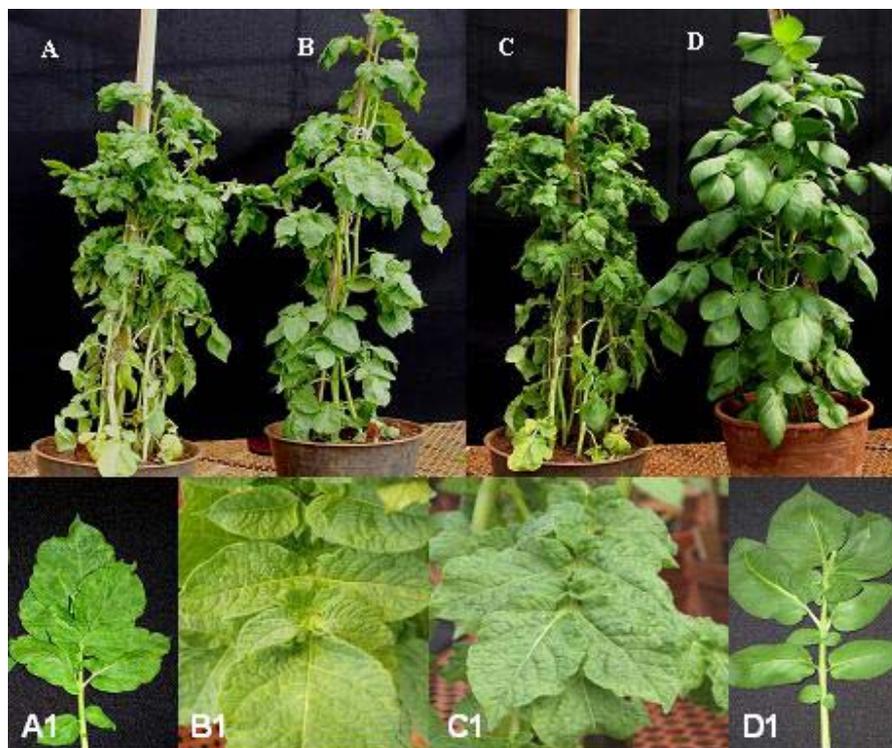


FIGURA 3. Plantas de batata cv. Ágata infectada com os vírus. A- PVS + PVY +PVX; B- PVS + PVX+PLRV; C- PVS+ PVY +PLRV; D- Sadia. A1, B1, C1, D1 - detalhes nas folhas das respectivas plantas.

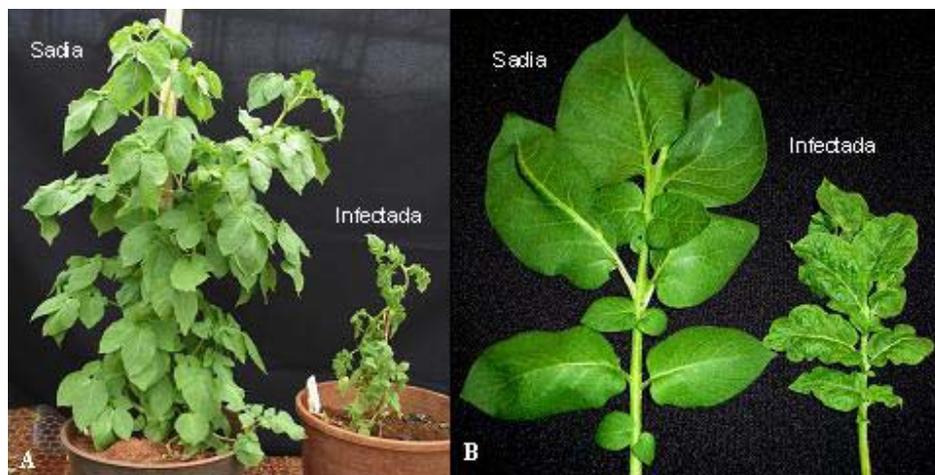


FIGURA 4. A- Plantas de batata cv. Ágata infectada com os quatro vírus: PVS + PVY + PVX + PLRV; B- Detalhe dos sintomas na folha.

Desse modo, observou-se que, quando o PVS se associa a outros vírus, os sintomas são intensificados, bem como o sintoma do outro vírus com o qual se associa, mostrando efeito sinérgico que pode levar à redução na produção da planta. Esses resultados confirmam os anteriormente relatados por Geraldino et al. (2005), que também observaram efeito sinérgico em plantas de batata das cultivares Atlantic, Ágata e Monalisa infectadas com PVS+PVY. A severidade dos sintomas apresentados devido à associação dos dois vírus aumentou consideravelmente, caracterizada pelo aparecimento de mosaico mais intenso, enrugamento e diminuição da área foliar, nas três cultivares testadas. Os sintomas secundários provocados em plantas oriundas dos tubérculos infectados foram mais intensos nas plantas com PVS+PVY.

O efeito das interações mistas também pode ser observado no número e no tamanho dos tubérculos. Quando infectada com um ou dois vírus, a planta produziu, em média, 12 tubérculos por planta, tendo mais de 60% de tubérculos

sido de tamanhos médios (menores que 45mm e maiores que 28mm), enquanto que tubérculos graúdos quase não foram encontrados. No caso das associações entre os quatro vírus e também nas triplas, somente foram colhidos tubérculos miúdos (menores que 28mm) e em pequena quantidade, variando entre 8 a 10 tubérculos por planta. De modo geral, observou-se que o acúmulo de partículas virais na planta infectada é inversamente proporcional ao tamanho e ao número de tubérculos produzidos por ela.

3.2 Efeito do PVS em infecções simples e mistas na produção de batata em condições de campo

Os dados referentes a produção comercial média estimada por área, diminuição da produção em relação ao controle, bem como o número de tubérculos classificados por tipo, estão representados na Tabela 1. Pode-se observar que a produção foi relativamente baixa (tratamento controle = 15,6 ton/ha), se considerarmos a produção média mínima desejável de, pelo menos, 25 toneladas por hectare. Isso aconteceu porque o local de condução do experimento é caracterizado por baixas temperaturas e umidade relativa do ar muito alta, o que favoreceu a incidência de requeima no campo, causada pelo fungo *Phytophthora infestans*. Mesmo utilizando-se as medidas de controle disponíveis, pelo fato de a área plantada ficar próxima a regiões onde se cultivam batata o ano todo, existe alto potencial de inóculo desse fungo.

TABELA 1. Média da produção comercial (Kg/ha), do número de tubérculos comerciais por planta e das perdas (%) induzidas pelos vírus PVS, PVX, PVY e PLRV, sozinhos ou combinados, em batata cv. Ágata.

Tratamentos	Incidência inicial	Produção comercial (kg/ha)	Perdas (%)	Número de Tubérculos Graúdos	Número de Tubérculos Médios
1 - PVS	50%	13210,65a ^{II}	15,30	1,03a	4,00a
2 - PVY	50%	12118,13a	22,31	0,95a	3,40a
3 - PVX	50%	13256,30a	15,01	0,97a	4,34a
4 - PVS+PVY	50%	11495,02a	26,30	0,68a	3,53a
5 - PVS+PVX	50%	12605,35a	19,18	0,85a	4,12a
6 - PVX+PVY	50%	11302,27a	27,54	0,86a	3,39a
7 - PVS+PVX+PVY	50%	9821,05a	37,03	0,50a	3,90a
13 - SADIO	Controle	15597,22a	-	1,24a	4,00a
8 - PLRV	15%	13883,68a	10,99	1,19b	4,10a
9 - PVS+PLRV	15%	12148,83a	22,11	0,82a	3,77a
10 - PVS+PLRV+PVX	15%	11677,87a	25,13	0,77a	3,68a
11 - PVS+PLRV+PVY	15%	9549,14a	38,78	0,74a	3,38a
12 - PVS+PLRV+PVY+PVX	15%	9215,24a	40,92	0,65a	3,73a
13 - SADIO	Controle	15597,22a	-	1,24b	4,00a

^{II} Na mesma coluna tratamentos com a mesma letra não diferem entre si estatisticamente pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Quando se empregou uma incidência inicial de 50% de vírus, embora não tenham sido detectadas diferenças significativas entre os tratamentos (Tabela 1A), as reduções na produção, devido às diferentes combinações de vírus, variaram de 15,01% (tratamento 3) a 37,03% (tratamento 7). Nos tratamentos em que os tubérculos continham apenas um vírus, a diminuição na produção variou de 15,01% para o PVX a 22,31% para o PVY.

A produção obtida nas parcelas compreendidas pelas plantas infectadas pelo PVS e o PVX foi de 12.605,35kg/ha, o que significou uma porcentagem de perda de 19,18% em relação ao controle, com 15.597,22kg/ha. Esses valores podem ser considerados baixos, quando comparados com as interações entre o PVS e PVY (26,30%) e PVX com PVY (27,54%), mas são altos quando comparados com valores encontrados por Manzer et al. (1978). Esses autores, ao inocularem isolados de PVX com severidades diferentes em plantas de batata, cultivares Russet Burbank, Kennebec e Katahdin, infectadas com PVS, obtiveram queda na produção de 2% quando o PVS estava associado a uma estirpe menos severa de PVX e, quando combinado com uma estirpe moderada de PVX, uma queda de 5%, além de induzir sintomas de mosaico bem visível, o que também foi observado neste trabalho (Figura 2). Entretanto, como as perdas induzidas por vírus em batata dependem da cultivar, da espécie e da estirpe de vírus, essas diferenças são esperadas. Por exemplo, German (2001) mencionou reduções de 40% na produção de plantas infectadas com PVS e PVX. Wright (1970) erradicou esses vírus por meio de incisão e do tratamento de brotos auxiliares e obteve um aumento na produção de tubérculos de 10% a 32%, com conseqüente aumento na produção total de 11% a 38%, evidenciando uma drástica queda na produção quando os vírus se encontram associados.

Uma interação que mereceu destaque foi entre o PVS e PVY, com perdas na ordem de 26,30%. Essa associação, em casa de vegetação, acarretou uma diminuição considerável no tamanho da planta (Figura 2-D), refletindo na

diminuição da produção de tubérculos no vaso e, ainda, na produção em campo, que foi de 12.605,35kg/ha em relação ao controle, que produziu 15.597,22kg/ha.

Das interações duplas, a que mais afetou a produção foi a combinação do PVS com o PLRV, que induziu uma porcentagem de perda de 22,11%. Esse valor pode ser considerado muito elevado, levando-se em conta que a porcentagem de infecção neste tratamento foi de apenas 15%. Marton et al. (1993) encontraram uma redução na produção de plantas, cv. Achat, de 77,55%, empregando 100% de infecção com PLRV e PVS. Esses resultados sugerem que a cultivar Ágata usada neste trabalho deve ser mais suscetível que a cv. Achat.

As interações que envolveram o PVX e o PVY numa mesma planta induziram perdas maiores na produção. Isso já era esperado, considerando-se que existe um efeito sinérgico quando esses infectam simultaneamente uma planta.

Nas parcelas em que se empregou 15% de incidência inicial, as perdas variaram de 10,99% nas plantas infectadas apenas com PLRV a 40,92%, nas plantas contendo os quatro vírus. Dessas interações, as que induziram sintomas mais drásticos, em casa de vegetação, foram aquelas que continham a combinação PLRV + PVY + PVS. Portanto, ela merece atenção especial, uma vez que poderiam ser capazes de acarretar maior degenerescência dos tubérculos e, conseqüentemente, perdas mais significativas na produção de batata. Outro agravante, referente a essa interação, é que os três vírus, no caso da estirpe andina (PVS^A), podem ser transmitidos por afídeos vetores, o que torna a sua disseminação no campo e, conseqüentemente, o seu controle mais difícil e menos eficiente.

Quanto ao número de tubérculos comerciais por planta (Tabela 1), nas interações com 50% de incidência não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos analisados em relação ao controle. O mesmo não ocorreu em infecções dupla, triplas e quádrupla, envolvendo o PLRV, nas

quais foram detectadas diferenças significativas. Estes resultados evidenciam que associação do PVS com outros vírus implica em diminuição no número de tubérculos graúdos afetando diretamente a produção comercial.

Os valores do Coeficiente de variação para a produção comercial estão apresentados na Tabela 1A. Estes valores são semelhantes aos valores normalmente encontrados para a produção comercial na cultura da batata.

Diante dos resultados encontrados em casa de vegetação e no ensaio de campo fica evidente que o PVS é um vírus muito importante e merece atenção, visto que os sintomas induzidos e as perdas na produção causadas pela associação do PVS com os outros vírus, que comumente ocorrem na cultura da batata, são altamente significativas tanto para a produção de batata-semente quanto para a produção de batata para consumo.

4 CONCLUSÕES

- 1- A presença do PVS nas interações provocou sintomas mais intensos que a de cada vírus separadamente, sendo que as interações com PVS+PLRV+PVY, foram as que induziram sintomas mais severos em casa de vegetação.
- 2- Nas parcelas com infecção inicial de 50%, as maiores perdas na produção (kg/ha) foram causadas pela combinação PVS+PVX+PVY e as menores pela infecção simples com o PVX.
- 3- Nas parcelas com infecção inicial de 15%, as maiores perdas na produção (kg/ha) foram causadas pela combinação dos quatro vírus e as menores pela infecção simples com o PLRV.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BEEMSTER, A.B.R.; DE BOKX, J.A. Survey of properties and symptoms. In: De BOKX, J.A.; Van der WANTS. (Ed.). **Viruses of potato and seed potato production**. 2.ed. Wageningen: Pudoc, 1987. p. 84-113.
- GERALDINO, P.S.; FIGUEIRA, A.R.; BARROCAS, E.N.; GALVINO, S.B.F.; FERRO, H.M. Efeito sinérgico entre o PVS (*Potato virus S*) e o PVY (*Potato virus Y*) em diferentes cultivares de batata. **Fitopatologia Brasileira**, v.30, p.S186, 2005.
- GERMAN, T.L. *Potato virus S*. In: STEVENSON, W.R. et al. (Ed.). **Compendium of potato diseases**. 2.ed. St Paul, 2001. p.67.
- MANZER F.E.; MERRIAM, D.C.; HELPER, P.R. Effects of *Potato virus S* and two strains of *Potato virus X* on yield of Russet Burbank, Kennebec, and Katahdin cultivars in Maine. **American Potato Journal**, v.55, p.601-609, 1978.
- MÁRTON, L.; BUSO, J.A.; DUSI, A.N.; REIS, N.V.B. Degenerescência devido a viroses em cultivares de batata. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.11, p.82, 1993. Resumos.
- RAMALHO, M.A.P.; FERREIRA, D.F.; OLIVEIRA, A.C. **Experimentação em genética e melhoramento de plantas**. 2.ed. Lavras: UFLA, 2005. p.233-254.
- SILBERSCHMIDT, K. A degenerescência da batatinha. **O Biológico**. n. 9, p.247-251, 1937.
- WETTER, C. **Description of plant viruses: *Potato virus S***. Surrey, England: Commonw. Mycol. Inst. /Assoc.Appl.Biol.,Kew. 1971. n.60.
- WRIGHT, N.S. (Seventh Report of International Committee on Taxonomy of Virus.Combined effects *Potato viruses X* and *S* on yield of Netted Gem and White Rose potatoes. **American Potato Journal**, v.47, p.475-478, 1970.

ANEXOS

TABELA 1A. Resumo da análise de variância da produção comercial (kg/hectares) obtida pela avaliação dos tratamentos com 50% e 15% de incidência de viroses, respectivamente. Lavras, MG, 2007.

FV	50% de incidência			15% de incidência		
	GL	QM	P	GL	QM	P
Tratamentos	7	11659404,41	0,2511	5	24299953,76	0,0433
Repetição	3	4310574,87	0,6709	3	2555814,85	0,8112
Erro	21	8236847,68		15	8003058,96	
Média		12425,74			12011,99	
CV (%)		23,10			23,55	

TABELA 2A. Resumo da Análise de Variância do número de tubérculos graúdos por planta, obtida pela avaliação dos tratamentos com 50% e 15% de incidência de viroses, respectivamente. Lavras, 2007.

FV	50% de incidência			15% de incidência		
	GL	QM	P	GL	QM	P
Tratamentos	7	0,198371	0,0260	5	0,251414	0,0194
Repetição	3	0,104803	0,2301	3	0,017082	0,8527
Erro	21	0,067434		15	0,065552	
Média		0,883438			0,902083	
CV (%)		29,39			28,38	

TABELA 3A. Resumo da Análise de Variância do número de tubérculos médios por planta, obtida pela avaliação dos tratamentos com 50% e 15% de incidência de viroses, respectivamente. Lavras, 2007.

FV	50% de incidência			15% de incidência		
	GL	QM	P	GL	QM	P
Tratamentos	7	0,487729	0,5227	5	0,243507	0,9086
Repetição	3	3,185133	0,0044	3	0,790106	0,4391
Erro	21	0,540250		15	0,827102	
Média		3,828750			3,769167	
CV (%)		19,20			24,13	

```

AL-VIV      -----ATGCCGCCTAAACCGGATCCGACAAGCTCAGGAGAGA
PE-SHE      -----ATGCCGCCTAAACCGGATCCGACAAGCTCAGGAGAGA
BB-AND      -----ATGCAGCCAAAACCGATTCCTTCTAGTTCAGGGGTTTC
RS-BAR      -----ATGCCGCCTAAACCGGATCCGACAAGCTCAGGAGAGA
SJ-AST      -----ATGCCGCCTAAACCGGATCCGACAAGCTCAGGAGAGA
SJ-ATL      -----ATGCCGCCTAAACCGGATCCGACAAGCTCAGGAGAGA
SJ-CAL      -----ATGCCGCCTAAACCGGATCCGACAAGCTCAGGAGAGA
SJ-CHI      -----ATGCCGCCTAAACCGGATCCGACAAGCTCAGGAGAGA
SJ-CHR      -----ATGCCGCCTAAACCGGATCCGACAAGCTCAGGAGAGA
IDA.R       -----ATGCCGCCAAAACCGGATCCGACAATTTTCAGGAGAGA
SM-AST      -----ATGCCGCCTAAACCGGATCCGACAAGCTCAGGAGAGA
AF493950    GAAGAAACTGTCCCACAGAGAAAATGCCGCCAAAACCGGATCCGACAAGCTCAGGAGAGA
AF493951    GAATATACAGTCTCACAGCAAGAATGCCGCCTAAACCGATCCATCTAGTTCAGGGGAAG
AJ863509    -----ATGGCGCCAAAACCGGATCCGACAAGCTCAGGAGAGA
AJ863510    -----ATGCCGCCTAAACCGATCCATCTAGCTCAGGGGAAG
AJ889246    -----ATGCCGCCAAAACCGGATCCGACGAGCTCAGGAGAGA
AJ512653    -----ATGCCGCCAAAACCGGATCCGACAAGCTCAGGAGAGA
D00461      -----ATGCCGCCTAAACCGATCCATCTAGCTCAGGGGAAG
DQ315387    -----ATGCCGCCTAAACCGATCCGACGAGCTCAGGAGAGA
DQ786653    -----ATGCCGCCAAAACCGGATCCGTCAAGTTCAGGAGAGA
S45593      -----ATGCCGCCGAAAACCGGATCCGACAAGCTCAGGAGAAA
U74375      -----ATGCCGCCTAAACCGGATCCGACAAGCTCAGGAGAGA
U74376      -----ATGCCGCCTAAACCGGATCCGACAAGCTCAGGAGAGA
Y15609      -----ATGCCGCCTAAACCGATCCGACAAGCTCAGGAGAGA
Y15611      -----ATGCCGCCTAAACCGATCCGACAAGCTCAGGAGAGA
Y15625      -----ATGCCGCCTAAACCGATCCGACAAGCTCAGGAGAGG
AY687337    -----ATGCCGCCAAAACCGGATCCCACGAGCTCAGGAGAGG

```

“...Continua...”

FIGURA 3A. Alinhamento das seqüências de nucleotídeos do gene da capa protéica dos dez isolados estudados, dezesseis isolados disponíveis no GenBank e um isolado brasileiro.

FIGURA 3A. "CONT."

AL-VIV CACCACAAGCACTCCCGCTTGTGCCGCCGCCCGAATGTAGAGGAGCATAGAGTTGGCC
PE-SHE CACCACAAACTGTTCCGCTTGCGCCGCCCGCCAGGAACGTAGAGGAGCATAGAGTTGGCC
BB-AND AGGCACAAGCAGAGCCACCTGCACCTCCTCCGAGCGCAATGGAAGGGCACAGATTCGCGC
RS-BAR CACCACAAACTGGTCCGCTTGTGCCGAAAACCAGGAATGTTGAGGAGCATAGAGTTGGCC
SJ-AST CACCACAAACTGTTCCGCTTGCGCCGCCCGCCAGGAACCTTACAGGAGCATAGAGTTGGCC
SJ-ATL CACCACAAACTGTCCCGCTTGCGCCGCCCGCCAGGAACGTAGAGGAGCATAGAGTTGGCC
SJ-CAL CACCACAAACTGTGCAGCTCGCGAAAGAGCCCAGGAACGTAGAGGAGCATAGGGTTGGCC
SJ-CHI CACCACAAACTGTCTCGCTTGCGCCGCCCGCCAGGAACGTAGCGGAGCATAGAGTTGGCC
SJ-CHR CACCACAAACTGTGCCGCTTGCGCCGCCCGCCAGGAACGTAGAGGAGCATAGAGTTGGCC
IDA.R CGCCACAAGCTGTACCACTAGCACCGCCGCCCGCCCGGACCGTAGAGGAGCATAGAGTTGGTC
SM-AST CGCCACAAGCACTTCCGCTTGCAGCCGCCCGCCCGAATGTAGAGGAGCATAGAGTTGGCC
AF493950 CACCACAAGCACCGCCGCTTGTGCCGCCGCCCGAATGTAGAGGAGCATAGAGTTGGCC
AF493951 CACCACAAGCAATGCCATATGCGCCACCGCCGAGAGCAGCGGAAGAACAAGGCTGGAC
AJ863509 CACCACAAGCACCGCCGCTTGTGCCGCCACCCCGAATGTAGAGGAGCATAGAGTTGGCC
AJ863510 CACCACAAGCGATGCAACCTGCACCACCACCGCGCGCA---GAAGGGCACATGTATGCGC
AJ889246 CACCACAAGCGATACCGCTTGCGCCGCCCGCCCGGCACGTAGAGGAGCATAAAGTTGGCC
AJ512653 CACCACAAGCACTGCCGCTTGTGCCGCCGCCCGAATGTAGAGGAGCATAGAGTTGGCC
D00461 CACCACAAGCGATGCAACCTGCACCACCACCGCGCGCA---GAAGGGCACATGTATGCGC
DQ315387 CACCACAAGCTACCACTTGCGCCGCCCGCCCGAATGTAGAGGAGCATAGAGTTGGCC
DQ786653 CACCACAAGCAACGCCGCTTGTGCCGCCGCCCGAATGTAGAGGAGCATAGAGTTGGCC
S45593 CACCACAAGCGATACCGCTTGCGCCGCCCGCCCGAATGTATATCATAGAATTGGCC
U74375 CACCACAAACTGTGCCGCTTGTGCCGCCCGCCAGGAACGTAGAGGAGCATAGAGTTGGCC
U74376 CACCACAAACGATGCCGCTTGTGCCGCCCGCTCGGAATGTAGAGGAGCATAGAGTTGGTT
Y15609 CACCACAAGCACTGCCGCTTGTGCCGCCGCCCGAATGTAGAGGAGCATAGAGTTGGTC
Y15611 CACCACAAGCAATGCCGCTTGTGCCGCCGCCCGAATGTAGAGGAGCATAGAGTTGGCC
Y15625 CACCACAAGCAATGCCGCTTGTGCCGCCGCCCGAATGTAGAGGAGCATAGAGTTGGCC
AY687337 TGCCACAAGCACCGCCGCTTGTGCCGCCGCCCGAATGTAGAGGAGCATAGAGTTGGCC

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

"...Continua..."

FIGURA 3A. "CONT."

AL-VIV CAAGTCAAGGGCACGGGCAGAATGAAGAGGCTATGCTGGAGCAGAGGCTCATCAGGTTGA
PE-SHE CAAATCAAGGGCACGGGCAGAATGAAGAGGCTATGCTGGAGCAGAGGCTCATCAGGTTGA
BB-AND AATCGGAGGGCCAGAGCAAAATGAAGAAGCCATGCTGGAACAAAGGCTTGTTAGATTGA
RS-BAR CAAATCAAGGGCACGGGCAGAATGAAGAGGCTATGCTGGAGCAGAGGCTCATCAGGTTGA
SJ-AST CAAATCAAGGGCACGGGCAGAATGAAGAGGCTATGCTGGAGCAGAGGCTCATCAGGTTGA
SJ-ATL CAAATCAAGGGCACGGGCAGAATGAAGAGGCTATGCTGGAGCAGAGGCTCATCAGGTTGA
SJ-CAL CAAATCAAGGGCACGGGCAGAATGAAGAGGCTATGCTGGAGCAGAGGCTCATCAGATTGA
SJ-CHI CAAATCAAGGGCACGGGCAGAATGAAGAGGCTATGCTGGAGCAGAGGCTCATCAGGTTGA
SJ-CHR CAAATCAAGGGCACGGGCAGAATGAAGAGGCTATGCTGGAGCAGAGGCTCATCAGGTTGA
IDA.R CAAATCAAGGGCACGGGCAGAATGAAGAGGCTATGCTGGAACAGAGGCTCATCAGATTGA
SM-AST CAAGTCAAGGGCACGGGCAGAATGAAGAAGCTATGCTGGAGCAGAGGCTCATCAGATTGA
AF493950 CAAATCAAGGGCACGGGCAGAATGAAGAGGCTATGCTGGAGCAGAGGCTCATCAGGTTGA
AF493951 CATCTCTGGGTCCAGGACCAAATGAAGAAGCAATGTTAGAGCAAAGACTCGTCAGATTGA
AJ863509 CAAGTCAAGAGCACGGGCAGAATGAAGAGGCTATGCTGGAGCAGAGGCTCATCAGGTTGA
AJ863510 AACCAGAAGGGCCAGGGCAAAACGAGGAAGCCATGCTGGAGCAAAGACTCATCAGGTTGA
AJ889246 CAAATCAAGGGCCAGGGCAGAATGAAGAGGCTATGCTGGAGCAAAGGCTCATCAGGTTGA
AJ512653 CAAGTCAAGGGCACGGGCAGAATGAAGAGGCTATGCTGGAGCAGAGGCTCATCAGGTTGA
D00461 AACCAGAAGGGCCAGGGCAAAACGAGGAAGCCATGCTGGAGCAAAGACTCATCAGGTTGA
DQ315387 CAATTCAAGGGCACGGGCAGAATGAAGAGGCTATGCTGGAGCAGAGGCTCATCAGATTGA
DQ786653 CAAATCAAGGGCCTGGGCAGAATGAAGAGGCTATGCTGGAGCAGAGGTTAATTAGATTGA
S45593 CAAACCAAGGGCACGGGCAAAATGAAGAGGCTATGCTGGAGCAGAGGCTCATCAGACTGA
U74375 CAAATCAAGGGCACGGGCAGAATGAAGAGGCCATGCTGGAGCAGAGGCTCATCAGGTTGA
U74376 CAAGTCAAGGGCACGGGCAGAGTGAGGAGGCTATGCTGGAGCAGAGGCTCATCAGATTGA
Y15625 CAAGTCAAGGGCACGGGCAGAATGAAGAGGCTATGCTGGAACAGAGGCTCATCAGGTTGA
Y15609 CAAGTCAAGGGCACGGGCAGAATGAAGAGGCTATGCTGGAGCAGAGGCTCATCAGATTGA
Y15611 CAAGTCAAGGGCACGGGCAGAATGAAGAGGCTATGCTGGAGCAGAGGCTCATCAGGTTGA
AY687337 CAAATCAAGGGCAAGGGCAGAATGAAGAGGCTATGCTGGAGCAGAGGCTCATCAGGTTGA

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

"...Continua..."

FIGURA 3A. "CONT."

AL-VIV TTGAACTCATGGCCTCAAAAAGGCACAATTCAACATTGAGCAACATCTCTTTTGAGATAG
PE-SHE TTGAACTCATGGCCTCGAAAAGGCACAATTCTACATTGAGCAACATCTCTTTTGAGATAG
BB-AND TTGAGCTTATGGCCAAAAAGGCACAACCTCGACATTGAGTAACATCTCCTTTTGAGATAG
RS-BAR TTGAACTCATGGCCTCGAAAAGGCACAATTCAACATTGAGCAACATCTCTTTTGAGATAG
SJ-AST TTGAACTCATGGCCTCGAAAAGGCACAATTCTACATTGAGCAACATCTCTTTTGAGATAG
SJ-ATL TTGAACTCATGGCCTCGAAAAGGCACAATTCTACATTGAGCAACATCTCTTTTGAGATAG
SJ-CAL TTGAACTCATGGCCTCGAAAAGGCACAATTCTACATTGAGCAACATCTCTTTTGAGATAG
SJ-CHI TTGAACTCATGGCCTCGAAAAGGCACAATTCTACATTGAGCAACATCTCTTTTGAGATAG
SJ-CHR TTGAACTCATGGCCTCGAAAAGGCACAATTCTACATTGAGCAACATCTCTTTTGAGATAG
IDA.R TTGAACTCATGGCCTCGAAAAGGCACAATTCAACATTGAGCAACATCTCTTTTGAGATAG
SM-AST TTGAACTCATGGCCTCAAAAAGGCACAATTCAACGTTGAGCAACATCTCTTTTGAGTTAG
AF493950 TTGAACTCATGGCCTCAAAAAGGCACAATTCAACATTGAGCAACATCTCTTTTGAGATAG
AF493951 TTGAGCTCATGGCCGAAAAGGCATAACTCAACGTTGAGCAACATCTCCTTTTGAGATAG
AJ863509 TTGAACTCATGGCCTCAAAAAGGCACAATTCAACATTGAGCAACATCTCTTTTGAGATAG
AJ863510 TTGAGCTCATGGCTACGAAGAGGCACAACCTCGACATTGAGCAACATCTCCTTTGAAATAG
AJ889246 TTGAACTCATGGCCTCGAAGAGGCACAATTCAACATTGAGCAACATCTCTTTTGAGATAG
AJ512653 TTGAACTCATGGCCTCAAAAAGGCACAATCCAACATTGAGCAACATCTCTTTTGAGATAG
D00461 TTGAGCTCATGGCTACGAAGAGGCACAACCTCGACATTGAGCAACATCTCCTTTGAAATAG
DQ315387 TTGAACTCATGGCCTCGAAAAGGCACAATTCAACATTGAGCAACATCTCTTTTGAGATAG
DQ786653 TTGAGCTCATGGCCTCGAAAAGGCACAATTCAACGTTGAGCAACATCTCTTTGAGATAG
S45593 TTGAACTCATGGCCTCGAAAAGGCACAATTCAACATTGAGCAACATAGCTTTTGAGATAG
U74376 TTGAACTCATGGCCTCAAAAAGGCACAATTCAACATTGAGCAACATCTCTTTTGAGATAG
U74375 TTGAACTCATGGCCTCGAAAAGGCACAATTCAACATTGAGCAACATCTCTTTTGAGATAG
Y15609 TTGAACTCATGGCCTCAAAAAGGCACAATTCAACATTGAGCAACATCTCTTTTGAGATAG
Y15611 TTGAACTCATGGCCTCAAAAAGGCACAATTCAACATTGAGCAACATCTCTTTTGAGATAG
Y15625 TTGAACTCATGGCCTCAAAAAGGCACAATTCAACATTGAGCAACATCTCTTTTGAGATAG
AY687337 TTGAACTCATGGCCTCAAAAAGGCACAATTCAACATTGAGCAACATCTCTTTTGAGATAG

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

"...Continua..."

FIGURA 3A. "CONT."

AL-VIV TTGCAATCATGAAGAATCGCGCGGGATTGAGAAAAGTGTGCAGGCTGTATGCTCCAGTCG
PE-SHE TTGCAATTATGAAGAATCGCGCGGGATTGAGGAAAAGTGTGCAGGCTGTATGCTCCAGTCG
BB-AND TTGCAATCATGAAAAATCGTGCTGGACTGAGGAAAAGCGTGCAGGCTGTATGCCCCGGTCG
RS-BAR TTGCAATTATGAAGAATCGCGCGGGCTTGAGGAAAAGTGTGCAGGCTGTACGCTCCAGTCG
SJ-AST TTGCAATTATGAAGAATCGCGCGGGATTGAGGAAAAGTGTGCAGGCTGTATGCTCCAGTCG
SJ-ATL TTGCAATTATGAAGAATCGCGCAGGATTGAGGAAAAGTGTGCCGGCTGTATGCTCCAGTCG
SJ-CAL TTGCAATTATGAAGAATCGCGCGGGATTGAGGAAAAGTGTGCAGGCTGTATGCTCCAGTCG
SJ-CHI TTGCAATTATGAAGAATCGCGCGGGATTGAGGAAAAGTGTGCAGGCTGTATGCTCCAGTTG
SJ-CHR TTGCAATTATGAAGAATCGCGCGGGATTGAGGAAAAGTGTGCAGGCTGTATGCTCCAGTCG
IDA.R TTGCAATCATGAAGAATCGCGCGGGATTGAGAAAAGTGTGCAGGCTGTACGCTCCAGTCG
SM-AST TTGCAATTATGAAGAATCGCGCGGGATTGAGAAAAGTGTGCAGGCTGTATGCTCCAGTCG
AF493950 TTGCAATCATGAAGAATCGCGCGGGATTGAGAAAAGTGTGCAGGCTGTATGCTCCAGTCG
AF493951 TTGCCATCATGAAAAATCGAGCAGGGTTGAGGAAAGTGTGTAGGTTGTATGCTCCAGTTG
AJ863509 TTGCAATTATGAAGAATCGCGCGGGATTGAGAAAAGTGTGCAGGTTGTATGCTCCAGTCG
AJ863510 TCGCAATCATGAAAAACCGTGCTGGGTTGAGGAAAGTGTGTAGGTTGTATGCTCCGGTCG
AJ889246 TTGCAATTATGAAGAATCGCGCGGGTTT GAGGAAAAGTGTGCAGGCTGTATGCTCCAGTCG
AJ512653 TTGCAATCATGAAGAATCGCGCGGGATTGAGAAAAGTGTGCAGGCTGTATGCTCCAGTCG
D00461 TCGCAATCATGAAAAACCGTGCTGGGTTGAGGAAAGTGTGTAGGTTGTATGCTCCGGTCG
DQ315387 TTGCAATCATGAAGAATCGCGCGGGATTGAGAAAAGTGTGCAGGCTGTACGCTCCAGTCG
DQ786653 TTGCAATCATGAAGAATCGCGCGGGATTGAGAAAAGTGTGCAGGCTGTATGCCCCAGTCG
S45593 TTGCAATTATGAAGAATCGCGCGGGATTGAGAAAAGTGTGCAGGCTGTATGCTCCAGTTG
U74375 TTGCAATTATGAAGAATCGCGCGGGCTTGAGGAAAAGTGTGCAGGCTGTACGCCCCAGTCG
U74376 TTGCAATCATGAAGAATCGCGCGGGTTGAGAAAAGTGTGCAGGCTGTATGCTCCAGTCG
Y15609 TTGCAATCATGAAGAATCGCGCGGGTTGAGAAAAGTGTGCAGGCTGTATGCTCCTGTCG
Y15611 TTGCAATCATGAAGAATCGCGCGGGATTGAGAAAAGTGTGCAGGCTGTATGCTCCAGTCG
Y15625 TTGCAATCATGAAGAATCGCGCGGGTTGAGAAAAGTGTGCAGGCTGTACGCTCCAGTCG
AY687337 TTGCAATCATGAAGAATCGCGCGGGACTGAGGAAAAGTGTGCAGGCTGTATGCTCCAGTCG

* *

"...Continua..."

FIGURA 3A. "CONT."

AL-VIV TGTGGAATTACATGCTAGTCCAGAATAGGCCACCTTCGGATTGGCAGGCCATGGGATTTTC
PE-SHE TGTGGAATTACATGCTAGTCCAGAATAGGCCACCTTCGGATTGGCAGGCTATGGGATTCC
BB-AND TAAAGAATTACATGCTCGTTCAGAACAGGCCCTCCATCGGATTGGCAGGCAATGGGGTTTC
RS-BAR TGTGGAATTACATGCTAGTCCAGAATAGGCCACCTTCGGATTGGCAGGCTATGGGATTCC
SJ-AST TGTGGAATTACATGCTAGTCCAGAATAGGCCACCTTCGGATTGGCAGGCTATGGGATTCC
SJ-ATL TGTGGAATTACATGCTAGTCCAGAATAGGCCACCTTCGGATTGGCAGGCTATGGGATTCC
SJ-CAL TGTGGAATTACATGCTAGTCCAGAATAGGCCACCTTCGGATTGGCAGGCTATGGGATTTTC
SJ-CHI TGTGGAATTACATGCTAGTCCAGAATAGGCCACCTTCGGATTGGCAGGCTATGGGATTCC
SJ-CHR TGTGGAATTACATGCTAGTCCAGAATAGGCCACCTTCGGATTGGCAGGCTATGGGATTCC
IDA.R TGTGGAATTACATGCTAGTCCAGAATAGGCCACCTTCGGATTGGCAGGCGATGGGATTTTC
SM-AST TGTGGAATTACATGCTAGTCCAGAATAGGCCACCTTCGGATTGGCAGGCCATGGGATTTCC
AF493950 TGTGGAATTACATGCTAGTCCAGAATAGGCCACCTTCGGATTGGCAGGCCATGGGATTTTC
AF493951 TTTGGAACTACATGCTTGTTCAGAACAGGCCCCCGTCAGACTGGCAAGCCATGGGGTTTC
AJ863509 TGTGGAATTACATGCTAGTCCAAAAATAGGCCACCTTCAGATTGGCAGGCCATGGGATTTTC
AJ863510 TTTGGAATTATATGCTTGTTCAGAAATAGGCCACCTTCAGATTGGCAGGCCATGGGGTTTC
AJ889246 TGTGGAATTACATGCTAGTCCAGAATAGGCCACCTTCGGATTGGCAGGCCATGGGATTCC
AJ512653 TGTGGAATTACATGCTAGTCCAGAATAGGCCACCTTCGGATTGGCAGGCCATGGGATTTTC
D00461 TTTGGAATTATATGCTTGTTCAGAAATAGGCCACCTTCAGATTGGCAGGCCATGGGGTTTC
DQ315387 TGTGGAATTACATGCTAGTCCAGAATAGGCCACCTTCGGATTGGCAGGCCATGGGGTTTC
DQ786653 TGTGGAATTACATGTTAGTTCAGAAATAGNCCACCCTTCGGATTGGCAGGCCATGGGATTTTC
S45593 TGTGGAATTACATGCTAGTCCAGAATAGACCACCTTCGGATTGGCAGGCCATGGGATTTTC
U74375 TGTGGAATTATATGCTAGTCCAAAAATAGGCCACCTTCGGATTGGCAGGCTATGGGATTCC
U74376 TGTGGAACTATATGCTAGTCCAGACAAAACCACCTTCGGATTGGCAGGCCATGGGATTCC
Y15609 TGTGGAATTACATGCTAGTCCAGAATAGGCCACCTTCGGATTGGCAGGCCATGGGATTTTC
Y15611 TGTGGAATTACATGCTAGTCCAGAATAGGCCACCGTCAGATTGGCAGGCCATGGGATTTTC
Y15625 TGTGGAATTACATGCTAGTCCAGAATAGGCCACCTTCGGATTGGCAGGCCATGGGATTTTC
AY687337 TGTGGAATTACATGCTAGTCCAGAATAGGCCACCTTCGGATTGGCAGGCCATGGGATTTTC

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

"...Continua..."

FIGURA 3A. "CONT."

AL-VIV AGTGGAACGCACGCTTCGCCGCATTTGACACATTCGATTATGTGACTAATGGGGCTGCAG
PE-SHE AATGGAATGCACGCTTCGCCGCATTTGACACATTCGATTATGTGACTAATGGGGCTGCAA
BB-AND AATGGAATGCTCGTTTCGCCGCTTTTACACATTTGATTATGTGACTAACGGCGCCGCGA
RS-BAR AATGGAATGCACGCTTCGCCGCGTTTACACATTCGATTATGTGACTAATGGGGCTGCAA
SJ-AST AGTGGAAATGCACGCTTCGCCGCATTTGACACATTCGATTATGTGACTAATGGGGCTGCAA
SJ-ATL AATGGAATGCACGCTTCGCCGCATTTGACACATTCGATTATGTGACTAATGGGGCTGCAA
SJ-CAL AATGGAATGCACGCTTCGCCGCATTTGACACATTCGATTATGTGACTAATGGGGCTGCAA
SJ-CHI AATGGAATGCACGCTTCGCTGCATTTGACACATTCGATTATGTGACTAACGGGGCTGCAA
SJ-CHR AATGGAATGCACGCTTCGCTGCATTTGACACATTCGATTATGTGACTAATGGGGCTGCAA
IDA.R AATGGAACGCACGCTTTGCCGCATTTGACACATTCGATTATGTGACTAATGGGGCTGCAG
SM-AST AGTGGAAATGCACGCTTCGCCGCATTTGACACATTCGATTATGTGACTAATGGGGCCGCGAG
AF493950 AGTGGAAACGCACGCTTCGCCGCATTTGATACATTCGATTATGTGACTAATGGGGCTGCAG
AF493951 AATGGAATGCGCGCTTCGCCGCTTTTACACTTTTACTATGTGACTAACGGTGCTGCAA
AJ863509 AGTGGAAACGCACGTTTCGCCGCATTTGACACATTCGATTATGTGACTAATGGGGCTGCAG
AJ863510 AATGGAATGCACGTTTCGCCGCTTTTACACATTTGATTATGTGACTAACGGCGCTGCAA
AJ889246 AATGGAATGCACGCTTCGCCGCATTTGACACATTCGACTATGTGACTAATGGGGCTGCAA
AJ512653 AGTGGAAACGCACGCTTCGCCGCATTTGACACATTCGATTATGTGACTAATGGGGCTGCAG
D00461 AATGGAATGCACGTTTCGCCGCTTTTACACATTTGATTATGTGACTAACGGCGCTGCAA
DQ315387 AATGGAATGCACGCTTCGCCGCATTTGACACATTCGATTATGTGACTAATGGGGCTGCAG
DQ786653 AATGGAATGCACGTTTCGCCGCATTTGACACATTCGATTATGTGACTAATGGGGCTGCAA
S45593 AATGGAATGCACGTTGCGCCGCATTTGACACATTTGATTATGTGACCAATGGGGCTGCAG
U74376 AATGGAATGCACGTTGCGCCGCATTTGACACATTCGATTATGTGACTAATGGGGCTGCAG
U74375 AATGGAATGCACGTTGCGCCGCATTTGACACATTCGATTATGTGACTAATGGGGCTGCAA
Y15609 AGTGGAAACGCACGCTTCGCCGCATTTGACACATTCGATTATGTGACTAACGGGGCTGCAG
Y15611 AGTGGAAACGCACGCTTCGCCGCATTTGACACATTCGATTATGTGACTAATGGGGCAGCAG
Y15625 AATGGAATGCACGCTTCGCCGCATTTGACACATTCGATTATGTGACTAATGGGGCTGCAA
AY687337 AGTGGAAACGCACGCTTCGCCGCATTTGACACATTCGATTATGTGACTAATGGGGCTGCAG

* * * * *

"...Continua..."

FIGURA 3A. "CONT."

```
AL-VIV      CCCACAA-----GAGTATGGCAATTGACAAGTCGAACAGAAATGAGCGATTGGCCA
PE-SHE      CCCACAA-----GAGTATGGCGATTGACAAGTCGAACAGAAATGAGCGATTGGCCA
BB-AND      CTCACAA-----GAGCATGGCAATTGGCAAGAACAACAGAAATGAAAGGCTGGCCA
RS-BAR      CCCACAA-----GAGTATGGCAATTGACAAGTCGAACAGAAATGAGCGATTGGCCA
SJ-AST      CCCACAA-----GAGTATGGCGATTGACAAGTCGAACAGAAATGAGCGATTGGCCA
SJ-ATL      CCCACAA-----GAGTATGGCGATTGACAAGTCGAACAGAAATGAGCGATTGGCCA
SJ-CAL      GCCACAA-----GAGCATGGCAATTGACAAGTCGAACAGAAATGAGCGGTTGGCCA
SJ-CHI      CCCACAA-----GAGTATGGCGATTGACAAGTCGAACAGAAATGAGCGATTGGCCA
SJ-CHR      CCCACAA-----GAGTATGGCGATTGACAAGTCGAACAGAAATGAGCGATTGGCCA
IDA.R       CCCTCAA-----GAGTATGGCAATTGCCAAGTGTAAACAGAAATGAGCGATTGGCCA
SM-AST      CTCACAA-----GAGTATGGCAATTGACAAGTCGAACAGAAATGAGCGATTGGCCA
AF493950    CCCACAA-----GAGTATGGCAATTGACAAATCGAACAGAAATGAGCGATTGGCCA
AF493951    CGCACAA-----GAGCATGGCGCTCGATAAGTCAAACAGAAATGAAAGGCTGGCCA
AJ863509    CCCACAA-----GAGTATGGCAATTGACAAGTCGAACAGAAATGAGCGATTGGCCA
AJ863510    CTCACAA-----GAGCATGGCTATTGATAAGTGAACAGAAATGAAAGGTTGGCTA
AJ889246    CCCACAA-----GAGTATGGCAATTGACAAGTCGAACAGAAATGAGCGATTGGCCA
AJ512653    CCCACAA-----GAGCATGGCAATTGACAAGTCGAACGAAATGAGCGATTGGCCA
D00461      CTCACAA-----GAGCATGGCTATTGATAAGTGAACAGAAATGAAAGGTTGGCTA
DQ315387    CCCACAA-----GAGTATGGCAATTGACAAGTCGAACAGAAATGAGCGATTGGCCA
DQ786653    CCCACAA-----GAGTATGGCAATTGACAAGTCGAACAGAAATGAGCGATTGGCCA
S45593      CCCACAATGCCACAAAGAGTATGGCAATTGACAAGTCGAACAGAAATGAGCGATTGGCCA
U74375      CCCACAA-----GAGTATGGCGATTGACAAGTCGAACAGAAATGAGCGATTGGCCA
U74376      CCCACAA-----GAGCATGGCAATTGACAAGTCGAACAGAAATGAGCGATTGGCCA
Y15609      CCCACAA-----GAGTATGGCAATTGACAAGTCGAACAGAAATGAGCGATTGGCCA
Y15611      CCCACAA-----GAGTATGGCAATTGACAAGTCGAACAGAAATGAGCGATTGGCCA
Y15625      CCCACAA-----GAGCATGGCAATTGATAAGTGAACAGAAATGAGCGATTAGCCA
AY687337    CCCACAA-----GAGTATGGCAATTGACAAGTCGAACAGAAATGAGCGATTGGCCA
```

```
* * * * *          * * * * *          * * * * *          * * * * *
```

"...Continua..."

FIGURA 3A. "CONT."

AL-VIV AACTAATGTTGAGTACACTGGAGGGATGCTGGGGACTGAGATTGTGCGCAATCACCGCA
PE-SHE AACTAATGTTGAGTACACTGGAGGAATGCTGGACGCTGAGATTGTGCGCAATCACCGTA
BB-AND ACACCAACGTTGACTTCCCTGGGGACAGTATCGGCGCTGAGTTTCCGTGCAAGTCAACCGA
RS-BAR ACACGAAAGTTGAGTACACTTATGGGATGCTTGGATCTGAGATTGTGCGCAATCACCGTA
SJ-AST AACTAATGTTGAGTACACTGGAGGGATGCTTGGCAGAGAGATTGTGCGCAATCACCGTA
SJ-ATL AACTAAAGTTGAGTACACTGGAGGGATGCTTGGAACTGAGATTGTGCGCAATCACCGTA
SJ-CAL AACTAGCATTGAGTACACTGTGGTGATGCTTGGCACTGAGATTGTGCGCAATCACCGTA
SJ-CHI AACTGATGTTGAGTACACTGGAGGAATGCTTGGAGATGAGATTGTGCGCAATCACCGTA
SJ-CHR AACTGATGTTGAGTACACTGGAGGAATGCGATCAACCAA-----
IDA.R AACTAATGTTGAGTACTCTGGAGGGATGCTTGGCGATGAGATTGTGCGCAATCACCGTA
SM-AST AACTAATGTCGAGTACACTGGAGGGATGCTTGGAGCTGAGATTGTGCGCAATCACCGTA
AF493950 AACTAATGTTGAGTACACTGGAGGGATGCTTGGCGCTGAGATTGTGCGCAATCACCGCA
AF493951 AACTAATGTTGAGTACACTGGAGGGATGCTTGGCGCTGAGATTGTGCGCAATCACCGCA
AJ863509 AACTAATGTTGAGTACACTGGAGGGATGCTTGGCGCTGAGATTGTGCGCAATCACCGTA
AJ863510 ACACCAACGTTGAGTATACTGGGGGCATGCTCGGTGCTGAGATTGTGCGTAATCATCGGA
AJ889246 AACTAATGTTGAGTACACTGGAGGGATGCTTGGCGCTGAGATTGTGCGCAATCACCGTA
AJ512653 AACTAATGTTGAGTACACTGGAGGGATGCTTGGCGCTGAGATTGTGCGCAATCACCGCA
D00461 ACACCAACGTTGAGTATACTGGGGGCATGCTCGGTGCTGAGATTGTGCGTAATCATCGGA
DQ315387 CCACTAATGTTGAGTACACTGGAGGGATGCTAGGCGCTGAGATTGTGCGCAATCACCGTA
DQ786653 AACTAATGTTGAGTACACTGGAGGGATGCTTGGCGCTGAGATTGTGCGCAATCACCGTA
S45593 AACTAATGTTGAGTACACTGGAGGGATGCTTGGCGCTGAGATTGTGCGCAATCACCGTA
U74375 AACTAATGTTGAGTACACTGGAGGGATGCTTGGCGCTGAGATTGTGCGCAATCACCGTA
U74376 AACTAATGTTGAGTACACTGGAGGAATGCTTGGCGCTGAGATTGTGCGCAATCATCGTA
Y15609 AACTAATGTTGAGTACACTGGAGGGATGCTTGGCGCTGAGATTGTGCGCAATCACCGCA
Y15611 AACTAATGTTGAGTACACTGGAGGGATGCTTGGCGCTGAGATTGTGCGCAATCACCGCA
Y15625 AACTAATGTTGAGTACACTGGAGGGATGCTTGGCGCTGAGATTGTGCGCAATCACCGTA
AY687337 AACTAATGTTGAGTACACTGGAGGGATGCTTGGCGCTGAGATTGTGCGCAATCACCGCA

*** * * * * * *

"...Continua..."

FIGURA 3A. "CONT."

```
AL-VIV      ATGCGATCAACCAA-----
PE-SHE      ATGCGATCAACCAA-----
BB-AND      ATGCAGCAAATGAATGA-----
RS-BAR      ATGCGATCAACCAA-----
SJ-ATL      ATGCGATCAACCAA-----
SJ-AST      ATGCGA-----
SJ-CAL      ATGCGATCAACCAA-----
SJ-CHI      ATGCGATCAACCAA-----
SJ-CHR      -----
IDA.R       ACGCGATCAACCAA-----
SM-AST      ATGCGAC--ATCA-----
AF493950    ATGCGATCAACCAATGAAGGCAGACCGTTTAGCCATGTTATTATTGTGTGTCCATCA-
AF493951    ATGCAATAAACCAATGAAGGCGAGCGTTTAGAAATGTTACTGTTGTGTGTTACAGG
AJ863509    ATGCGATCAACCAATGA-----
AJ863510    ATGCAATAAACCAATGA-----
AJ889246    ACGCGATCAACCAATGA-----
AJ512653    ATGCGATCAACCAATGA-----
D00461      ATGCAATAAACCAATGA-----
DQ315387    ATGCGATCAACCAATGA-----
DQ786653    ATGCAATCACCCAATGA-----
S45593      ATGCGATCAACCAATGA-----
U74375      ATGCGATCAACCAATGA-----
U74376      ATGCGATCAACCAATGA-----
Y15609      ATGCGATCAACCAATGA-----
Y15611      ATGCGATCAACCAATGA-----
Y15625      ATGCGATCAACCAATGA-----
AY687337    ACGCGATCAACCAATGA-----
.*****:***** ***.*****:***:***:***** *****.*
```

AL-VIV	-----
PE-SHE	-----
BB-AND	-----
RS-BAR	-----
SJ-AST	-----
SJ-ATL	-----
SJ-CAL	-----
SJ-CHI	-----
SJ-CHR	-----
IDA.R	-----
SM-AST	-----
S45593	-----
AF493950	-----
AF493951	-----
AJ863509	-----
AJ863510	MLNAAQDATECTVLNSVLLGLRSRLVLRSETRKYKLRFANHWGISQAGQLRAHKRSSGGRA
AJ889246	-----
AY512653	-----
D00461	-----
DQ315387	-----
DQ786653	-----
U74375	-----
U74376	-----
Y15609	-----
Y15611	-----
Y15625	-----
AY687337	-----

“...Continua...”

FIGURA 4A. Alinhamento das seqüências de aminoácidos do gene da capa protéica dos dez isolados estudados, dezesseis isolados disponíveis no GenBank e um isolado brasileiro.

FIGURA 4A. "CONT."

```

AL-VIV -----MPPKPDPTSSGETPQALPLVPPPRNVEEHRVGPSQGHG
PE-SHE -----MPPKPDPTSSGETPQTVPLAPPPRNVEEHRVGNQGHG
BB-AND -----MQPKPDSSSSGVQAQAEPAPPPSAMEGHRFAQSEAPE
RS-BAR -----MPPKPDPTSSGETPQTVPLPKTRNVEEHRVGNQGHG
SJ-AST -----MPPKPDPTSSGETPQTVPLAPPPRNLEHRVGNQGHG
SJ-ATL -----MPPKPDPTSSGETPQTVPLAPPPRNVEEHRVGNQGHG
SJ-CAL -----MPPKPDPTSSGETPQTVQLAKEPRNVEEHRVGNQGHG
SJ-CHI -----MPPKPDPTSSGETPQTVSLAPPPRNVAEHRVGNQGHG
SJ-CHR -----MPPKPDPTSSGETPQTVPLAPPPRNVEEHRVGNQGHG
IDA.R -----MPPKPDPTISSGETPQAVPLAPPRTVEEHRVGNQGHG
SM-AST -----MPPKPDPTSSGETPQALPPAQPAPPPRNVEEHRVGPSQGHG
AF493950 -----MPPKPDPTSSGETPQAPPLVPPPRNVEEHRVGNQGHG
AF493951 -----MPPKDPSSSSGEAPQAMPYAPPRAAEEHKAGPSLGPG
AJ863509 -----MAPKPDPTSSGETPQAPPLVPPPRNVEEHRVGPSQEHG
AJ863510 TKAVETPLGSQVKARIYSLTARMPPKDPSSSSGEAPQAMQPAPPPR-AEGHMYAQPEGPG
AJ889246 -----MPPKPDPTSSGETPQAIPLAPPPRHVEEHRVGNQGPG
AY512653 -----MPPKPDPTSSGETPQALPPVPPPRNVEEHRVGPSQGHG
D00461 -----MPPKDPSSSSGEAPQAMQPAPPPR-AEGHMYAQPEGPG
DQ315387 -----MPPKPDPTSSGETPQATPLAPPPRNVEEHRVGIQGHG
DQ786653 -----MPPKDPSSSSGETPQATPLVPPPRNVEEHRVGNQGPG
S45593 -----MPPKPDPTSSGETPQAIPLAPPPRNVEEHRVGNQGHG
U74375 -----MPPKPDPTSSGETPQTVPLVPPPRNVEEHRVGNQGHG
U74376 -----MPPKPDPTSSGETPQTMPLVPPPRNVEEHRVGSQGHA
Y15609 -----MPPKPDPTSSGETPQALPPVPPPRNVEEHRVGPSQGHG
Y15611 -----MPPKPDPTSSGETPQALPLVPPPRNVEEHRVGPSQGHG
Y15625 -----MPPKPDPTSSGEAPQAMPLVPPPRNVEEHRVGPSQGHG
AY687337 -----MPPKPDPTSSGEVPQAPPLVPPPRNVEEHRVGNQGG

```

* * * * * . : ** . * : . . * .
 "...Continua..."

FIGURA 4A. "CONT."

AL-VIV QNEEAMLEQRLIRLIELMASKRHNSTLSNISFEIGRPSLEPTPEMRRNPENPYSRFSIDE
PE-SHE QNEEAMLEQRLIRLIELMASKRHNSTLSNISFEIGRPSLEPTPEMRRNPENPYSRFSIDE
BB-AND QNEEAMLEQRLVRLIELMAKRRHNSTLSNISFEIGRPSLEPTPEMRRNPENPYSRFSIDE
RS-BAR QNEEAMLEQRLIRLIELMASKRHNSTLSNISFEIGRPSLEPTPEMRRNPENPYSRFSIDE
SJ-AST QNEEAMLEQRLIRLIELMASKRHNSTLSNISFEIGRPSLEPTPEMRRNPENPYSRFSIDE
SJ-ATL QNEEAMLEQRLIRLIELMASKRHNSTLSNISFEIGRPSLEPTPEMRRNPENPYSRFSIDE
SJ-CAL QNEEAMLEQRLIRLIELMASKRHNSTLSNISFEIGRPSLEPTPEMRRNPENPYSRFSIDE
SJ-CHI QNEEAMLEQRLIRLIELMASKRHNSTLSNISFEIGRPSLEPTPEMRRNPENPYSRFSIDE
SJ-CHR QNEEAMLEQRLIRLIELMASKRHNSTLSNISFEIGRPSLEPTPEMRRNPENPYSRFSIDE
IDA.R QNEEAMLEQRLIRLIELMASKRHNSTLSNISFEIGRPSLEPTPEMRRNPENPYSRFSIGE
SM-AST QNEEAMLEQRLIRLIELMASKRHNSTLSNISFELGRPSLEPTPEMRRNPENPYSRFSIDE
AF493950 QNEEAMLEQRLIRLIELMASKRHNSTLSNISFEIGRPSLEPTPEMRRNPENPYSRFSIDE
AF493951 PNEEAMLEQRLVRLIELMAKRRHNSTLSNISFEIGRPALEPTPEMRRNPENPYSRFSIDE
AJ863509 QNEEAMLEQRLIRLIELMASKRHNSTLSNISFEIGRPSLEPTPEMRRNPENPYSRFSIDE
AJ863510 QNEEAMLEQRLIRLIELMATKRHNSTLSNISFEIGRPSLEPTPEMRRNPENPYSRFSIDE
AJ889246 QNEEAMLEQRLIRLIELMASKRHNSTLSNISFEIGRPSLEPTPEMRRNPENPYSRFSIDE
AY512653 QNEEAMLEQRLIRLIELMASKRHNPTLSNISFEIGRPSLEPTPEMRRNPENPYSRFSIDE
D00461 QNEEAMLEQRLIRLIELMATKRHNSTLSNISFEIGRPSLEPTPEMRRNPENPYSRFSIDE
DQ315387 QNEEAMLEQRLIRLIELMASKRHNSTLSNISFEIGRPSLEPTPEMRRNPENPYSRFSIDE
DQ786653 QNEEAMLEQRLIRLIELMASKRHNSTLSNISFEIGRPSLEPTPEMRRNPENPYSRFSIDE
S45593 QNEEAMLEQRLIRLIELMASKRHNSTLSNIAFEIGRPSLEPTPEMRRNPENPYSRFSIDE
U74375 QNEEAMLEQRLIRLIELMASKRHNSTLSNISFEIGRPSLEPTPEMRRNPENPYSRFSIDE
U74376 QSEEAMLEQRLIRLIELMASKRHNSTLSNISFEIGRPSLEPTPEMRRNPENPYSRFSIDE
Y15611 QNEEAMLEQRLIRLIELMASKRHNSTLSNISFEIGRPSLEPTPEMRRNPENPYSRFSIDE
Y15609 QNEEAMLEQRLIRLIELMASKRHNSTLSNISFEIGRPSLEPTPEMRRNPENPYSRFSIDE
Y15625 QNEEAMLEQRLIRLIELMASKRHNSTLSNISFEIGRPSLEPTPEMRRNPENPNSRFSIDE
AY687337 QNEEAMLEQRLIRLIELMASKRHNSTLSNISFEIGRPSLEPTPEMRRNPENPYSRFSIDE

.*****:***** ****.*****:***:***:***** ***** *

"...Continua..."

FIGURA 4A. "CONT."

AL-VIV TVEFPTGAVPLDSIIAIMKNRAGLRKVCRLYAPVVWNYMLVQNRPPSDWQAMGFQWNARF
PE-SHE TVEFPTGAVPLDSIIAIMKNRAGLRKVCRLYAPVVWNYMLVQNRPPSDWQAMGFQWNARF
BB-AND TVEFPTGAVPLDSIIAIMKNRAGLRKACRLYAPVVKNYMLVQNRPPSDWQAMGFQWNARF
RS-BAR TVEFPTGAVPLDSIIAIMKNRAGLRKVCRLYAPVVWNYMLVQNRPPSDWQAMGFQWNARF
SJ-AST TVEFPTGAVPLDSIIAIMKNRAGLRKVCRLYAPVVWNYMLVQNRPPSDWQAMGFQWNARF
SJ-ATL TVEFPTGAVPLDSIIAIMKNRAGLRKVCRLYAPVVWNYMLVQNRPPSDWQAMGFQWNARF
SJ-CAL TVEFPTGAVPLDSIIAIMKNRAGLRKVCRLYAPVVWNYMLVQNRPPSDWQAMGFQWNARF
SJ-CHI TVEFPTGAVPLDSIIAIMKNRAGLRKVCRLYAPVVWNYMLVQNRPPSDWQAMGFQWNARF
SJ-CHR TVEFPTGAVPLDSIIAIMKNRAGLRKVCRLYAPVVWNYMLVQNRPPSDWQAMGFQWNARF
IDA.R TVEFPTGAVPLDSIIAIMKNRAGLRKVCRLYAPVVWNYMLVQNRPPSDWQAMGFQWNARF
SM-AST TVEFPTGAVPLDSIIAIMKNRAGLRKVCRLYAPVVWNYMLVQNRPPSDWQAMGFQWNARF
AF493950 TVEFPTGAVPLDSIIAIMKNRAGLRKVCRLYAPVVWNYMLVQNRPPSDWQAMGFQWNARF
AF493951 TVEFPTGAVPLDSIIAIMKNRAGLRKVCRLYAPVVWNYMLVQNRPPSDWQAMGFQWNARF
AJ863509 TVEFPTGAVPLDSIIAIMKNRAGLRKVCRLYAPVVWNYMLVQNRPPSDWQAMGFQWNARF
AJ863510 TVEFPTGAVPLDSIIAIMKNRAGLRKVCRLYAPVVWNYMLVQNRPPSDWQAMGFQWNARF
AJ889246 TVEFPTGAVPLDSIIAIMKNRAGLRKVCRLYAPVVWNYMLVQNRPPSDWQAMGFQWNARF
AY512653 TVEFPTGAVPLDSIIAIMKNRAGLRKVCRLYAPVVWNYMLVQNRPPSDWQAMGFQWNARF
D00461 TVEFPTGAVPLDSIIAIMKNRAGLRKVCRLYAPVVWNYMLVQNRPPSDWQAMGFQWNARF
DQ315387 TVEFPTGAVPLDSIIAIMKNRAGLRKVCRLYAPVVWNYMLVQNRPPSDWQAMGFQWNARF
DQ786653 TVEFPTGAVPLDSIIAIMKNRAGLRKVRRLYAPVVWNYMLVQNXPPSDWQPMGFQWNARF
S45593 TVEFPTGAVPLDSIIAIMKNRAGLRKVCRLYAPVVWNYMLVQNRPPSDWQAMGFQWNARC
U74375 TVEFPTGAVPLDSIIAIMKNRAGLRKVCRLYAPVVWNYMLVQNRPPSDWQAMGFQWNARC
U74376 TVEFPTGAVPLDSIIAIMKNRAGLRKVCRLYAPVVWNYMLVQTKPPSDWQAMGFQWNARC
Y15609 TVEFPTGAVPLDSIIAIMKNRAGLRKVCRLYAPVVWNYMLVQNRPPSDWQAMGFQWNARF
Y15611 TVEFPTGAVPLDSIIAIMKNRAGLRKVCRLYAPVVWNYMLVQNRPPSDWQAMGFQWNARF
Y15625 TVEFPTGAVPLDSIIAIMKNRAGLRKVCRLYAPVVWNYMLVQNRPPSDWQAMGFQWNARF
AY687337 TVEFPTGAVPLDSIIAIMKNRAGLRKVCRLYAPVVWNYMLVQNRPPSDWQAMGFQWNARF

*****:*****.*****.*****.*****.*****

"...Continua..."

FIGURA 4A. "CONT."

AL-VIV AAFDTFDYVTNGAAVQPVEGLIRRPTPEETIAHN---AHKSMAIDKSNRNERLANTNVEY
PE-SHE AAFDTFDYVTNGAAIQPVEGLIRRPTPEETIAHN---AHKSMAIDKSNRNERLANTNVEY
BB-AND AAFDTFDYVTNGAAIQPVEGLIRRPTPEETIAHN---AHKSMAIGKNNRNERLANTNVDF
RS-BAR AAFDTFDYVTNGAAIQPVEGLIRRPTPEETIAHN---AHKSMAIDKSNRNERLANTKVEY
SJ-AST AAFDTFDYVTNGAAIQPVEGLIRRPTPEETIAHN---AHKSMAIDKSNRNERLANTNVEY
SJ-ATL AAFDTFDYVTNGAAIQPVEGLIRRPTPEETIAHN---AHKSMAIDKSNRNERLANTKVEY
SJ-CAL AAFDTFDYVTNGAAIQPVEGLIRRPTPEETIAHN---GHKSMAIDKSNRNERLANTSIEY
SJ-CHI AAFDTFDYVTNGAAIQPVEGLIRRPTPEETIAHN---AHKSMAIDKSNRNERLANTDVEY
SJ-CHR AAFDTFDYVTNGAAIQPVEGLIRRPTPEETIAHN---AHKSMAIDKSNRNERLANTDVEY
IDA.R AAFDTFDYVTNGAAVQPVEGLIRRPTPEETIAH---NALKSMAIAKCNRNERLANTNVEY
SM-AST AAFDTFDYVTNGAAVQPVEGLIRRPTPEETIAHN---AHKSMAIDKSNRNERLANTNVEY
AF493950 AAFDTFDYVTNGAAVQPVEGLIRRPTPEETIAHN---AHKSMAIDKSNRNERLANTNVEY
AF493951 FAFDTFDYVTNGAAIQPVEGLIRRPTPEETIAHN---AHKSMAIDKSNRNERLANTNVEY
AJ863509 AAFDTFDYVTNGAAVQPVEGLIRRPTPEETIAHN---AHKSMAIDKSNRNERLANTNVEY
AJ863510 AAFDTFDYVTNGAAIQPVEGLIRRPTPEETIAHN---AHKSMAIDKSNRNERLANTNVEY
AJ889246 AAFDTFDYVTNGAAIQPVEGLIRRPTPEETIAHN---AHKSMAIDKSNRNERLANTNVEY
AY512653 AAFDTFDYVTNGAAVQPVEGLIRRPTPEETIAHN---AHKSMAIDKSNRNERLANTNVEY
D00461 AAFDTFDYVTNGAAIQPVEGLIRRPTPEETIAHN---AHKSMAIDKSNRNERLANTNVEY
DQ315387 AAFDTFDYVTNGAAVQPVEGLIRRPTPEETIAHN---AHKSMAIDKSNRNERLATTNVEY
DQ786653 AAFDTFDYVTNGAAIQPVEGLIRRPTPEETIAHN---AHKSMAIDKSNRNERLANTNVEY
S45593 AAFDTFDYVTNGAAVQPVEGLIRRPTPEETIAHNAHNAHKSMAIDKSNRNERLANTNVEY
U74375 AAFDTFDYVTNGAAIQPVEGLIRRPTPEETIAHN---AHKSMAIDKSNRNERLANTNVEY
U74376 AAFDTFDYVTNGAAVQPIEGLIRRPTPEETIAHN---AHKSMAIDKSNRNERLANTNVEY
Y15609 AAFDTFDYVTNGAAVQPVEGLIRRPTPEETIAHN---AHKSMAIDKSNRNERLANTNVEY
Y15611 AAFDTFDYVTNGAAVQPVEGLIRRPTPEETIAHN---AHKSMAIDKSNRNERLANTNVEY
Y15625 AAFDTFDYVTNGAAIQPVEGLIRRPTPEEAI AHN---AHKSMAIDKSNRNERLANTNVEY
AY687337 AAFDTFDYVTNGAAVQPVEGLIRRPTPEETIAHN---AHKSMAIDKSNRNERLANTNVEY

*****:*:*:*****:*** . ****: * * *****.*.::

"...Continua..."

FIGURA 4A. "CONT."

AL-VIV	TGGMLGTEIVRNHRNAINQ
PE-SHE	TGGMLDAEIVRNHRNAINQ
BB-AND	PGDSIGAEFPCSQPNAANE
RS-BAR	TYGMLGSEIVRNHRNAINQ
SJ-AST	TGGMLGREIVRNHRNA---
SJ-ATL	TGGMLGTEIVRNHRNAINQ
SJ-CAL	TVVMLGTEIVRNHRNAINQ
SJ-CHI	TGGMLGDEIVRNHRNAINQ
SJ-CHR	TGGMRSTK-----
IDA.R	SGGMLGDEIVRNHRNAINQ
SM-AST	TGGMLGAEIVRNHRNATS-
AF493950	TGGMLGAEIVRNHRNAINQ
AF493951	TGGMLGAEIVRNHRNAINQ
AJ863509	TGGMLGAEIVRNHRNAINQ
AJ863510	TGGMLGAEIVRNHRNAINQ
AJ889246	TGGMLGAEIVRNHRNAINQ
AY512653	TG-MLGAEIVRNHRNAINQ
D00461	TGGMLGAEIVRNHRNAINQ
DQ315387	TGGMLGAEIVRNHRNAINQ
DQ786653	TGGMLGAEIVRNHRNAITQ
S45593	TGGMLGAEIVRNHRNAINQ
U74375	TGGMLGAEIVRNHRNAINQ
U74376	TGGMLGAEIVRNHRNAINQ
Y15609	TGGMLGAEIVRNHRNAINQ
Y15611	TGGMLGAEIVRNHRNAINQ
Y15625	TGGMLGAEIVRNHRNAINQ
AY687337	TGGMLGAEIVRNHRNAINQ
*****.***** ***.*****.***.***.*	