

**EFEITO DE FUNGICIDAS NA PRODUÇÃO
DE BATATA E NA DISSEMINAÇÃO DE
VÍRUS E DETECÇÃO DOS VARIANTES
GENÉTICOS PVY^{Ni-Wi} e NE-11 NO BRASIL**

SUELLEN BÁRBARA FERREIRA GALVINO

2008

SUELLEN BÁRBARA FERREIRA GALVINO

**EFEITO DE FUNGICIDAS NA PRODUÇÃO DE BATATA E NA
DISSEMINAÇÃO DE VÍRUS E DETECÇÃO DOS VARIANTES
GENÉTICOS PVY^{N-Wi} e NE-11 NO BRASIL**

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

Orientadora:
Prof^ª. Dra. Antonia dos Reis Figueira

LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL
2008

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

Galvino, Suellen Bárbara Ferreira.

Efeito de fungicidas na produção de batata e na disseminação de vírus e detecção dos variantes genéticos PVY^{N-Wi} e NE-11 no Brasil./ Suellen Bárbara Ferreira Galvino. – Lavras: UFLA, 2008.

42 p.: il.

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

Orientador: Antonia dos Reis Figueira.

Bibliografia.

1. Fungicidas. 2. Piraclostrobina. 3. PVY. 3. batata .4. Metiran.
5. RT-PCR. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 635.21

SUELLEN BÁRBARA FERREIRA GALVINO

**EFEITO DE FUNGICIDAS NA PRODUÇÃO DE BATATA E NA
DISSEMINAÇÃO DE VÍRUS E DETECÇÃO DOS VARIANTES
GENÉTICOS PVY^{N-Wi} e NE-11 NO BRASIL**

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

APROVADA em 30 de setembro de 2008

Prof. César Augusto Brasil Pereira Pinto UFLA

Prof. Paulo Estevão de Souza UFLA

Profª. Dra. Antonia dos Reis Figueira
(Orientadora)

LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL

Aos meus pais, Elson e Jussara pelo amor e apoio incondicional

Aos meus familiares pelas orações e pelo imenso carinho e

Ao meu amor, Jaime, pela força que me sustentou

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelas grandes graças alcançadas durante a caminhada e por não permitir que eu desistisse.

A meus pais, pela confiança depositada em mim e por me auxiliarem nos momentos mais difíceis

À Universidade Federal de Lavras e ao Departamento de Fitopatologia, pela estrutura oferecida e pelo convívio com excelentes profissionais de diversas áreas importantes para minha formação acadêmica e pessoal

À Antonia dos Reis Figueira, orientadora e amiga, pela enorme carga de conhecimentos repassados, pelas lições de vida compartilhadas, e pela dedicação e amizade

Aos meus amigos do Laboratório de Virologia e Centro de Indexação de Vírus pela valiosa ajuda nos trabalhos de campo e casa de vegetação, em especial João Eduardo, Francisco Câmara e Sílvia Regina.

Às amigas Priscilla, Valquíria e Flávia agradeço pelo grande auxílio, e apoio o qual jamais serão esquecidos

A todos os amigos que me estenderam a mão nos momentos mais complicados demonstrando que a amizade verdadeira é um porto seguro na vida.

SUMÁRIO

RESUMO.....	i
ABSTRACT.....	ii
CAPÍTULO 1: Efeito de fungicidas na produção de batata e na disseminação de vírus.....	01
Resumo.....	02
Abstract.....	03
1.Introdução.....	04
2.Material e Métodos.....	07
2.1 Efeito do nível de adubação e do tratamento com piraclostrobina e metiran na produção e na disseminação de vírus em batata cultivar Cupido.....	07
2.2 Efeito do fungicida CabrioTop® na produção e disseminação de vírus em oito cultivares de batata.....	08
3. Resultados e discussão.....	09
3.1 Efeito do nível de adubação e do tratamento com piraclostrobina e metiran na produção e na disseminação de vírus em batata cultivar Cupido.....	09
3.2 Efeito do fungicida CabrioTop® na produção e disseminação de vírus em oito cultivares de batata.....	13
4.Conclusões.....	17
5.Referências bibliográfica.....	18
CAPÍTULO 2: Detecção dos variantes genéticos PVY ^{n-wi} e NE-11 no Brasil.....	21
Resumo.....	22
Abstract.....	23
1.Introdução.....	24
2.Material e Métodos.....	27
2.1 Descrição dos isolados estudados.....	27
2.2 Extração do RNA total.....	28
2.3 Reação de RT-PCR.....	29
2.4 Síntese do cDNA.....	30
2.5 Reação em cadeia da polimerase (PCR).....	30
3.Resultados e discussão.....	31
4. Conclusões.....	38
5. Referencia bibliográfica.....	39

RESUMO

GALVINO, Suellen Bárbara Ferreira. **Efeito de fungicidas na produção de batata e na disseminação de vírus e detecção dos variantes genéticos PVY^{N-Wi} e NE-11 no Brasil.** 2008. 42p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG*.

Neste trabalho inicialmente foi investigado o efeito do fungicida, cujo princípio ativo é piraclostrobina+Metiran (CabrioTop[®]), na produção de plantas de batata e na disseminação de vírus, em duas lavouras experimentais conduzidas no município de Maria da Fé e de São Gonçalo do Sapucaí-MG. Em Maria da Fé avaliou-se a influência de dois níveis de adubação (2.500 e 3.500kg/ha) e do tratamento com o fungicida na disseminação de vírus e na produção de plantas de batata da cultivar Cupido. Em São Gonçalo do Sapucaí avaliou-se também a disseminação viral e a produção de oito cultivares de batata, submetidas ao tratamento com CabrioTop[®]. Para isso, os tubérculos foram submetidos ao teste sorológico DAS-ELISA, antes do plantio e após a colheita, para avaliação da incidência viral. Além disso, após a colheita, todos os tubérculos foram pesados e classificados quanto ao seu tamanho. Em uma fase posterior, foram estudados nove isolados do *Potato virus Y* (PVY) escolhidos entre diversos isolados que foram coletados e estudados no DFP-UFLA, sendo quatro pertencentes à estirpe necrótica comum e cinco pertencentes ao variante PVY^{NTN}. Eles foram submetidos a reação de RT-PCR, utilizando-se *primers* recentemente desenvolvidos para detectar variantes da estirpe necrótica denominados de Wilga (PVY^{N-Wi}), e da PVY^{NTN}, NA e NE-11. Nos testes com o CabrioTop[®], observou-se que o tratamento com piraclostrobina não afetou as incidências inicial e final de vírus, em ambos os experimentos. No entanto, houve um incremento significativo na produção das plantas de batata tratadas da cultivar Cupido em relação às plantas controle, variando com o nível de adubação usado, sendo o maior ganho de 13,6%, quando as aplicações foram feitas apenas no sulco de plantio, adubado com 2.500kg/ha. Todas as parcelas tratadas com esse fungicida, nas oito cultivares testadas, apresentaram produção superior, em relação as parcelas não tratadas. Os testes de RT-PCR com os quatro isolados PVY^N, empregando os *primers* específicos para o isolado Wilga, permitiram a amplificação de uma banda típica com 4.115pb, nos isolados LAV-CL e MFE-AG. Empregando-se o *primer* NA, foi possível amplificar uma banda de 648 pb nos isolados PVY-AST, PVY-AGA e PVY-MON. O *primer* NE, amplificou uma banda de 978 pb para os isolados PVY-AGA e PVY-MON. Provavelmente o isolado PVY-AST apresenta outro tipo de variabilidade que apenas poderá ser verificado com o seqüenciamento completo do seu genoma. É a primeira vez que esses isolados de PVY são descritos no Brasil, e essa constatação demonstra novamente que o país está permitindo a entrada de novos isolados de PVY que tem aparecido nos países exportadores de batata-semente.

Palavras-chaves: fungicida, piraclostrobina, metiran, PVY, batata, RT-PCR

***Orientadora:** Antonia dos Reis Figueira – UFLA

ABSTRACT

GALVINO, Suellen Bárbara Ferreira. **Effect of fungicides on potato yield and virus spread and detection of the genetic variants PVY^{N-WI} and NE-11 in Brazil.** 2008. 42p. Dissertation (Master Program in Phytopathology) – Federal University of Lavras, Lavras, MG*

Two experiments were carried out in Maria da Fé and São Gonçalo do Sapucaí-MG in order to investigate the effect of the fungicide composed by piraclostrobina+Metiran (CabrioTop[®]) on potato plant yield and virus spread. At Maria da Fé was evaluated the influence of the fertilization levels (2,500 and 3,500kg/ha) and of the treatment with the fungicide on plant yield of the cultivar Cupido. At São Gonçalo do Sapucaí, was evaluated the effect of CabrioTop[®] on eight potato cultivars. Therefore, the tubers were submitted to the serologic test DAS-ELISA, before planting and after harvest, to evaluate the viral incidence. Moreover, after harvest, all the tubers were weighed and classified according to their size. At a later stage, four *Potato virus Y* (PVY) classified as PVY^N strain and five classified as PVY^{NTN} were chosen among isolates from DFP-UFLA collection and characterized. They were tested with *primers* which have been developed recently to detect variants Wilga, NA and NE-11. In the tests with the CabrioTop[®], it was observed that treatment with pyraclostrobin did not affect the viral incidences in both experiments. However, there was a significant increase in potato plant yield of the cultivar Cupido in relation to the control plants, which changed with the used fertilization level, the highest gain being of 13.6%, when the applications were done only in planting furrow and the fertilization was of 2,500kg/ha. All the plots treated with that fungicide, in the eight tested cultivars, showed higher yield, compared to the not treated plots. The RT-PCR tests on the four isolates PVY^N, employing the specific *primers* to the Wilga isolate, allowed the amplification of a typical band of 4,115pb, in the isolates LAV-CL and MFE-AG. By using the *primer* NA, it was possible to amplify a 648 pb band in the isolates PVY-AST, PVY-AGA and PVY-MON. The *primer* NE amplified a 978 band for the isolates of PVY-AGA and PVY-MON. Probably, the isolate PVY-AST presents another sort of variability which will only be able to be verified with the complete sequencing of its genome. It is the first time that those PVY isolates are reported in Brazil, and that finding shows again that Brazil is allowing the entrance of every new PVY isolate which has appeared in the potato-seed exporting countries.

Keywords: fungicide, piraclostrobine, metiran, PVY, potato, RT-PCR

***Adviser:** Antonia dos Reis Figueira - UFLA

CAPÍTULO 1

EFEITO DE FUNGICIDAS NA PRODUÇÃO DE BATATA E NA DISSEMINAÇÃO DE VÍRUS

1 RESUMO

GALVINO, Suellen Bárbara Ferreira. Efeito de fungicidas na produção de batata e na disseminação de vírus. In:____. **Efeito de fungicidas na produção de batata e na disseminação de vírus e detecção dos variantes genéticos PVY^{N-Wi} e NE-11 no Brasil**. 2008. Cap. 1, p. 1 - 20. (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG*.

No presente trabalho foi investigado o efeito do fungicida, cujo princípio ativo é piraclostrobina+Metiran (CabrioTop[®]), na produção de plantas de batata e na disseminação de vírus, em duas lavouras experimentais conduzidas no município de Maria da Fé e de São Gonçalo do Sapucaí-MG. Em Maria da Fé avaliou-se a influência de dois níveis de adubação (2.500 e 3.500kg/ha) e do tratamento com o fungicida na disseminação de vírus e na produção de plantas de batata da cultivar Cupido. Em São Gonçalo do Sapucaí avaliou-se também a disseminação viral e a produção de oito diferentes cultivares de batata, submetidas ao tratamento com CabrioTop[®]. As incidências virais, inicial e final, não foram afetadas pela utilização do fungicida, em ambos os experimentos. Houve um incremento significativo na produção das plantas de batata cultivar Cupido em relação às plantas controle, que variou com o nível de adubação usado, sendo o maior ganho de 13,6%, quando as aplicações feitas apenas no sulco de plantio, e a adubação foi de 2.500kg/ha. A produção de todas as oito cultivares testadas foi superior nas parcelas tratadas com CabrioTop[®], sendo que a cultivar Eole mostrou o maior ganho, de 22%. Isso indicou que a piraclostrobina, apesar de induzir um efeito fisiológico com reflexo na quantidade de produção, não afetou a disseminação de vírus no campo. Foi notada uma interação entre as doses de adubo e os tipos de tratamentos do fungicida empregado, bem como entre as cultivares e o tratamento fungicida, mostrando que a indicação da metodologia de aplicação desse fungicida não pode ser generalizada.

Palavras-chave: piraclostrobina + metiran; vírus; cultivares

***Orientadora:** Prof^ª Antônia dos Reis Figueira – UFLA

2 ABSTRACT

GALVINO, Suellen Bárbara Ferreira. Effect of fungicides on virus spread and on yield of potato (*solanum tuberosum*) plants. In: _____. **Effect of fungicides on potato yield and virus spread and detection of the genetic variants PVY^{N-WI} and NE-11 in Brazil.** 2008. Cap. 1, p. 1 - 20. (Dissertation in Phytopathology) – Federal University of Lavras, Lavras, MG*

The effect of the fungicide CabrioTop®, composed by piraclostrobina + metiran, on virus spread and on yield of potato plants was investigated. The first experiment was carried out with potato cultivar Cupido in potato crop located in Maria da Fé – MG. It was evaluated the influence of two fertilizer levels (2,5000 and 3,500kg/ha) and also of different treatments with the fungicide Cabrio Top on virus spread and on potato yield. The second experiment was accomplished with eight potato cultivars in São Gonçalo do Sapucaí - MG - Brazil and the virus spread and the yield of potato cultivars treated with Cabrio Top were compared with non treated control plants. The initial and final virus incidences were not affected by the use of the fungicide, in both experiments. The yield of potato plants cultivar Cupido varied with fertilizer levels, and the highest yield increase was 13.6 %, when the applications were done in the furrow at planting time and the fertilizer level was 2,500 kg/ha. The productions of all cultivars were superior in the plots treated with CabrioTop®, but the cultivar Eole showed the highest yield increase of 22%. It was concluded that piraclostrobina, in spite of inducing a physiologic effect and a consequent increase in production, did not affect the virus spread in the field. There was an interaction between the fertilizer levels and the methods of Cabrio Top application, as well as between the cultivars and the fungicide treatment, indicating that the methodology of the fungicide application cannot be generalized.

Keywords: Pyraclostrobin+metiran, virus, cultivate

Adviser: Professor: Antonia dos Reis Figueira - UFLA

3 INTRODUÇÃO

A busca pelo aumento quantitativo e qualitativo da produção de batata nas regiões produtoras brasileiras tem sido constante, visto que, apesar de o Brasil produzir cerca de 3 milhões de toneladas anuais, a sua produtividade é relativamente baixa quando comparada com países desenvolvidos (Agriannual, 2008; Food Agricultural Organization - FAO, 2008). As condições climáticas nacionais somadas ao sistema de plantio da cultura favorecem o desenvolvimento de vários patógenos, destacando-se as viroses por causarem rápida degenerescência dos tubérculos (Costa, 1948, 1965; Cupertino & Costa, 1970; Souza-Dias & Costa, 1984; Figueira et al., 1985; Bokx, 1987; Figueira, 1995; Souza-Dias, 1995).

A vulnerabilidade das lavouras de batata às viroses é agravada pela não existência de formas de controle curativo, devido ao modo de replicação dos fitovírus e de sua transmissão que ocorre, principalmente, através de tubérculos semente infectados e através de vetores no campo. Diante disto, medidas de caráter preventivo são de extrema importância para impedir ou diminuir perdas na produção (Figueira et al., 1985; Santos et al., 1986; Hull, 2002).

Recentemente, muitas pesquisas têm sido realizadas utilizando-se um grupo de fungicidas pertencentes à classe das estrobilurinas, os quais possuem ação direta sobre os processos fisiológicos de plantas infectadas ou não por patógenos, incluindo vírus. Estas moléculas de estrobilurinas integram um grupo de compostos secundários, com ação mitocondrial inibitória do transporte de elétrons entre o citocromo **b** e **c**, tornando o citoplasma ácido e aumentando a atividade da enzima nitrato redutase, o que culmina em uma maior absorção de nitrogênio pela planta (Anke, 1995; Glaab & Kaiser, 1999; Sauter et al., 1999).

Venancio et al. (2003) fizeram uma revisão a respeito do efeito de uma nova molécula da classe das estrobilurinas, a chamada piraclostroquina, sobre a

fisiologia de plantas submetidas ao tratamento com compostos contendo essas moléculas. Neste trabalho eles ressaltaram as significativas melhorias na resposta de defesa de plantas tratadas e expostas às condições de estresse, bem como a sua atuação direta na regulação hormonal e na maior assimilação de carbono e nitrogênio. Segundo Köehle et al. (2002) a assimilação de nitrogênio por plantas tratadas com piraclostrobina é maior que a de plantas não tratadas, culminando num aumento de biomassa em 20%. Sendo assim, os vários fungicidas pertencentes a essa classe, além de possuírem as esperadas atividades antifúngicas também atuam de forma a elevar a qualidade e o rendimento da colheita para o agricultor (Bergmann et al., 1999; Hermes et al., 2002; Venancio et al., 2003).

O efeito de um fungicida da família F500 (piraclostrobina) sobre plantas infectadas com vírus e bactérias foi investigado por Hermes et al. (2002). Ao infiltrar o fungicida em plantas de fumo (*Nicotiana tabacum* cv Xanthi nc), previamente tratadas e infectadas com TMV, eles verificaram uma indução muito mais rápida da expressão do gene *PRI TMV*, com conseqüente acúmulo da respectiva proteína, em plantas pré-tratadas do que nas plantas controle. Essa proteína é a responsável pelas lesões necróticas locais (HR) desenvolvidas em resposta à infecção viral, e a aceleração dessa resposta de defesa nas hospedeiras tratadas demonstrou a capacidade desse fungicida induzir resistência ao *Tobacco mosaic virus* (TMV). Outra evidência deste fato foi a redução de cerca de 50% do tamanho da lesão necrótica observada nas folhas de plantas tratadas. Resultados similares foram observados para a bactéria *Pseudomonas syringae* pv *tabaci* em plantas de fumo da mesma cultivar. Portanto, acredita-se que os fungicidas contendo piraclostrobina além da ação antifúngica atuam também na proteção das plantas aumentando a velocidade de sua resposta de defesa que, geralmente, é induzida tardiamente pelo próprio patógeno elicitor. Acredita-se que os fungicidas que têm como princípio ativo a piraclostrobina, a exemplo do

que acontece com outras substâncias deste grupo, são capazes de inibir a cadeia de transporte de elétrons e aumentar o nível de espécies reativas de oxigênio (ROS) dentro da mitocôndria. Isso induziria um aumento na expressão de genes nucleares de defesa ainda desconhecidos, resultando na inibição do movimento e da replicação viral (Xie et al., 2001).

O fungicida CabrioTop[®], que tem como princípios ativos piraclostrobina e metiran tem sido bastante estudado pela sua capacidade de causar o aumento do vigor em plantas de batata. A associação da piraclostrobina com metiran reforça o controle da doença fúngica no campo tornando mais difícil o surgimento de resistência ao produto, uma vez que a atuação de cada molécula sobre o fungo ocorre de forma diferente. A possibilidade desse fungicida atuar no desenvolvimento e mesmo na disseminação das doenças viróticas na lavoura, através da ativação de genes responsáveis por diminuir ou paralisar a replicação e movimentação das partículas virais, seria uma alternativa de manejo bastante atraente, uma vez que o mesmo é capaz de controlar de maneira bastante eficiente uma das principais doenças dessa cultura, a requeima causada pela *Phytophthora infestans* (Fagan, 2007; Grimm, 2007). Assim sendo, a utilização do produto no controle da requeima poderia proporcionar um benefício extra, atuando também na diminuição das perdas causadas pelas doenças viróticas.

Para investigar essa possibilidade, nesse trabalho foram conduzidos dois experimentos de campo, em duas regiões bastante distintas do estado de Minas Gerais, empregando-se diferentes cultivares de batata. Foram avaliadas a disseminação do vírus, considerando-se a sua incidência inicial e final nos tubérculos, a produção das plantas tratadas com CabrioTop[®], em relação às plantas sem tratamento e o efeito de dois níveis de adubação empregados.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Efeito do nível de adubação e do tratamento com piraclostrobina e metiran na produção e na disseminação de vírus em batata cultivar Cupido

O experimento foi conduzido na Estação Experimental da EPAMIG, no município de Maria da Fé em Minas Gerais, localizada a 1280m de altitude, 22°18'29" Sul de latitude e 45°22'32" Oeste de longitude, durante os meses de fevereiro a maio de 2007. O modelo experimental utilizado foi o de blocos casualizados (DBC), sendo cada parcela constituída de 4,8m², empregando-se 20 tubérculos e 8 repetições, com espaçamento de 0,8m entre linhas e de 0,30m entre plantas. Foram empregados dois níveis de adubação com (NPK 4:14:8)⁻¹, sendo o primeiro, abaixo do usualmente empregado, 2.500 kg/ha, e o segundo, seguindo o que tem sido utilizado pelo agricultor, 3.500kg/ha. Em cada nível de adubação foram aplicados os seguintes tratamentos com CabrioTop®: (i) aplicação do fungicida apenas no sulco de plantio, na dosagem de 2.000g/ha; (ii) pulverização do fungicida somente cerca de dez dias após a emergência das plântulas, na dosagem de 1.800g/ha; (iii) combinação dos dois tratamentos anteriores, ou seja, aplicação no sulco e pulverização dez dias após a emergência das plântulas; e (iv) controle, sem CabrioTop®. A pulverização do fungicida CabrioTop® nas parcelas tratadas após emergência foi realizada de forma bastante direcionada utilizando-se pulverizador costal manual com bico de pulverização do tipo cônico vazio, vazão de 500L/ha e pressão de bombeamento baixa, evitando-se assim, deriva entre as parcelas vizinhas.

Para determinação da incidência inicial e final de vírus, os tubérculos de batata foram submetidos ao teste sorológico DAS-ELISA (Clark & Adams, 1977), utilizando-se antissoros policlonais, antes do plantio e após a colheita. Para o controle fitossanitário foram empregados dois produtos químicos

recomendados para cultura da batata, sendo eles, o fungicida a base de pencycurão (Monceren PM) para combater *Rhizoctonia solani*, e o fungicida a base de metalaxyl + mancozeb (Ridomil Gold) para combater *Phytophthora infestans*. A frequência das aplicações variou de acordo com a incidência e severidade da doença no campo e com as recomendações do fabricante.

A avaliação da produção foi feita separando-se os tubérculos por tamanho, com o auxílio de duas peneiras capazes de separá-los de acordo com o tamanho de suas malhas: grandes (> 45mm de diâmetro), médios (>28mm<45mm) e pequenos (<28mm). A seguir esses foram pesados e os dados obtidos foram submetidos à análise de variância. Os valores das médias foram analisados pelo teste de Scott-Knott ao nível 5% de probabilidade, utilizando o programa computacional SISVAR[®].

4.2 Efeito do fungicida CabrioTop[®] na produção e disseminação de vírus em oito cultivares de batata

O experimento foi conduzido no município de São Gonçalo do Sapucaí - Minas Gerais, durante os meses de junho a setembro de 2007, visando investigar qual o efeito do fungicida piraclostrobina + metiran (CabrioTop[®]) na produção de plantas de oito cultivares francesas de batata: Bailla, Eole e Florice, destinadas ao cozimento; Canelle, Emeraude, Opaline e Soléia, destinadas tanto a fritura como ao cozimento e Gredine, que produz tubérculos miúdos, próprios para produção de tubérculos pré-cozidos, embalados à vácuo. Os tubérculos semente brotados, provenientes da câmara fria, foram plantados utilizando-se o delineamento experimental de blocos casualizados (DBC), sendo cada parcela constituída de 3,6m², empregando-se 15 tubérculos e 6 repetições. As parcelas foram submetidas a dois tratamentos: (i) aplicação do fungicida CabrioTop[®] na dose de 4.500 g/ha no sulco de plantio, seguido por pulverização com o mesmo produto na concentração de 1800 g/ha, cerca de 10 dias após a emergência das

plantas e (ii) controle, sem CabrioTop®. As doses do fungicida aplicadas foram escolhidas de acordo com recomendações do fabricante e com base em experimentos que vêm sendo realizados no campo, e as pulverizações com CabrioTop® seguiram a mesma metodologia do primeiro experimento evitando-se deriva entre as plantas.

A determinação da incidência inicial e final de vírus, a avaliação da produção, o teste de médias e os tratamentos fitossanitários realizados foram feitos utilizando-se a mesma metodologia descrita para o experimento anterior. O controle fitossanitário nesse caso foi realizado utilizando-se o fungicida a base de pencicurrão (Monceren PM) para combater *Rhizoctonia solani* e o inseticida a base de deltamethrin (Decis) para combater *Diabrotica speciosa* (vaquinha). O número de aplicações e as doses variaram de acordo com a incidência e severidade da doença no campo e com as recomendações do fabricante.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Efeito do nível de adubação e do tratamento com piraclostrobina e metiran na produção e na disseminação de vírus em batata cultivar Cupido

A análise dos tubérculos empregados como sementes, no primeiro experimento, mostrou uma incidência inicial de 1% para PVY. Após a colheita do experimento, a média da incidência final do PVY foi de 5% e a do PLRV, que estava ausente nas sementes, foi de 2%, em todas as parcelas do experimento, não havendo diferença entre os tratamentos utilizados. Portanto, os tratamentos com CabrioTop® parecem não ter influenciado na disseminação desses vírus no campo.

A incidência final mostrou que a disseminação do PVY e a transmissão do PLRV, de fora para dentro do campo, foram relativamente pequenas,

indicando que houve um bom controle com os tratamentos fitossanitários realizados. Trabalhos conduzidos em diferentes regiões têm indicado que a disseminação natural no campo pode chegar a mais de 20% na geração F1 e a mais de 40% nas gerações subseqüentes (Câmara et al., 1986; Andrade & Figueira, 1991).

Fazendo-se a análise da produção das plantas submetidas ao mesmo tratamento, nos dois níveis de adubação, observou-se que apenas as plantas que receberam um tratamento com Cabrio Top[®] após a emergência e as controle, que não foram tratadas, apresentaram produções superiores no maior nível de adubação, ou seja, aumentou de 12,36 ton/ha para 15,33 ton/ha (24,03%) nas tratadas e de 12,47 ton/ha para 14,18 ton/ha (13,71%) nas controle. As plantas com maior nível de adubação, que receberam tratamento apenas no sulco ou no sulco + emergência tiveram uma produção igual ou menor que as com menor nível.

As análises estatísticas mostraram que houve interação significativa ($p < 0,005$) entre o tratamento com fungicida aplicado nas parcelas e o nível de adubação de cada área. A verificação dessa interação foi importante, pois indicou que os tratamentos com fungicida (piraclostrobina+metiran) não podem ser generalizados para diferentes níveis de adubação. Além disso, mostrou que o tratamento das plantas na lavoura com menor quantidade de adubação levou a um maior ganho na produção, tendo sido semelhante à parcela com melhor desempenho no maior nível de adubação, com tratamento apenas após a emergência. Portanto, o produtor poderia economizar em adubo e investir no tratamento com esse produto que, como efeito adicional, proporciona um bom controle de importantes doenças fúngicas como a requeima.

Comparando-se os diferentes tratamentos dentro de cada nível de adubação, observou-se que, no menor nível, apenas dois dos tratamentos levaram a ganhos significativos em relação às parcelas controle: o tratamento

apenas no sulco (13,6%) e a combinação de tratamentos no sulco e pós-emergência (5,8%) (Tabela 1). No maior nível de adubação, o único tratamento que levou a um incremento de 8,1% em relação ao controle foi a pulverização das plantas cerca de 10 dias após a emergência.

TABELA 1. Produção das plantas de batata cultivar Cupido submetidas a diferentes tratamentos com CabrioTop®, em dois níveis de adubação. Maria da Fé-MG,2008.

Adubações	Produção Média por Tamanho de Tubérculo (T/ha)					Produção Total T/ha	% Ganho
	Tratamento/CabrioTop®	Grandes	% do total	Médios	% do total		
2.500 kg/ha							
Sulco	7,3 A*c**	51,6	6,6 Bb	46,2	0,3 Bc	14,2 Bc	13,6
Pós emergência	6,9 Ab	55,4	5,4 Aa	43,4	0,1 Aa	12,4 Aa	
Pós emergência + sulco	7,9 Ad	60,2	5,1 Aa	38,4	0,2 Ab	13,2 Ab	5,8
Controle	5,6 Aa	44,7	6,8 Bb	54,3	0,1 Aa	12,5 Aa	
3.500 kg/ha							
Sulco	7,9 Bb	58,3	5,5 Aa	40,8	0,1 Aa	13,6 Aa	
Pós emergência	9,8 Bc	63,7	5,4 Aa	35,0	0,2 Bb	15,3 Bc	8,1
Sulco + pós emergência	7,1 Ba	52,4	6,2 Bb	46,1	0,2 Ab	13,4 Aa	
Controle	7,9 Bb	55,6	6,1 Ab	43,2	0,2 Ab	14,2 Bb	

*Médias seguidas da mesma letra maiúscula, na coluna, não diferem entre si pelo Teste Scott Knott ao nível 5% de probabilidade, quando se comparam os oito tratamentos, dos dois níveis de adubação.

**Médias seguidas da mesma letra minúscula, na coluna, não diferem entre si pelo Teste Scott Knott ao nível 5% de probabilidade, quando se comparam os quatro tratamentos dentro de cada nível de adubação. (CV%=3.82).

Cupido é uma cultivar de batata que apresenta características ideais para fritura, de modo que a produção de tubérculos maiores é mais desejável. Considerando isso, todos os tratamentos com CabrioTop[®], no nível de adubação mais baixo foram melhores em relação ao controle, sendo que o que induziu uma maior produção de tubérculos grandes foi obtido no tratamento combinado, no sulco e pós-emergência, não coincidindo com o que apresentou maior produção total, com tratamento apenas no sulco. Já no nível de adubação maior, o melhor tratamento foi o pós - emergência, que coincidiu com a maior produção total (Tabela1).

Sabe-se que o CabrioTop[®] induz um efeito fisiológico nas plantas, resultando num aumento no teor de proteínas e da massa vegetal, com conseqüente aumento do rendimento das plantas (Koehle et al., 2002). Entretanto, o mecanismo de interação entre as estrobilurinas, a planta e o meio ambiente ainda necessita de maiores estudos. A aplicação do CabrioTop[®] no sulco de plantio, quando o nível de adubação é maior, parece não ter favorecido o desenvolvimento inicial da planta quando se empregou a cultivar Cupido. Torna-se necessário realizar outros experimentos, empregando diferentes níveis de adubação, com outras cultivares e dosagens de CabrioTop[®], para uma conclusão definitiva.

5.2 Efeito do fungicida CabrioTop[®] na produção e disseminação de vírus em oito cultivares de batata

Neste experimento verificou-se que a disseminação de vírus, nas plantas de batata das diversas cultivares, também não apresentou nenhuma diferença entre as parcelas tratadas e não tratadas. Os índices iniciais de vírus variaram de zero (cvs. Bailla, Emeraude, Eole, Florice e Soleia) a 7,8% de PVY (cultivar Opaline), enquanto que os demais vírus estavam ausentes. Na determinação do índice final de vírus, o PLRV apenas não foi detectado nas cultivares Gredine, Opaline e Soleia. Nas outras cultivares, o índice médio de PLRV variou de 1,2 a 4%, enquanto que o de PVY ficou entre 5,3% e 15,5%. As cultivares que apresentaram menor incidência de PVY

foram as Soleia (5,3%), Bailla e Florice (ambas em torno de 10%) e as que apresentaram maior índice de infecção foram Eole (14,3%), Gredine (15,4%) e Canelle (15,6%).

Cultivares diferentes geralmente apresentam uma variação na resistência à disseminação de vírus no campo. Estudando a degenerescência de seis cultivares de batata, Achat, Baraka, Baronesa, Bintje, Granola e Monalisa, em lavouras estabelecidas em Maria da Fé-MG, Andrade & Figueira (1991) observaram que da primeira para a segunda geração, a cultivar Bintje aumentou a incidência de PLRV de 29,1 para 90,9%, enquanto que a Monalisa aumentou de 10,7 para 24,4 %. No caso do PVY, as incidências das gerações F₁, que eram de 15 e 16,7% nas cultivares Bintje e Baraka aumentaram, respectivamente, para 90 e 83,3% na geração F₃.

A diferença entre a produção média das plantas tratadas e não tratadas com fungicida (piraclostrobina + metiran) variou para cada cultivar, nas condições desse experimento, mostrando que houve interação significativa entre a cultivar e o tratamento ($p < 0,005$).

Quando se analisa a proporção de tubérculos grandes produzidos por cada uma das cultivares (Tabela 2), observa-se a maior proporção de tubérculos graúdos foi observada na cultivar Florice, sendo que em seis delas as parcelas tratadas produziram um maior número de tubérculos que as não tratadas. Apenas nas cultivares Canelle e Soleia as não tratadas apresentaram produção igual e maior do que as tratadas, respectivamente. A menor proporção de tubérculos graúdos foi observada na cv Gredine, mas isso já era esperado, porque ela foi desenvolvida para produzir maior quantidade de tubérculos médios, para ser pré-cozida e embalada a vácuo. Nota-se que as parcelas tratadas da cultivar Gredine produziram uma maior quantidade de tubérculos médios que as não tratadas, o que representa um ganho, principalmente quando se considera que as parcelas não tratadas produziram mais tubérculos grandes do que as não tratadas. Apesar de se ter notado uma maior proporção geral de tubérculos médios na cultivar Bailla, isso não significa uma perda, pois essa é destinada também à fritura. Isso foi devido

ao fato de essa cultivar ter o tubérculo com diâmetro em torno de 45 mm, permitindo que ela passe através das malhas da peneira empregada na classificação. Entretanto, ela possui o tubérculo alongado, o que garante a sua utilização como pré-frita congelada ou para comercialização *in natura* para fritura.

Avaliando-se a produção total, a cultivar Eole apresentou o maior ganho de produção, com um incremento de 22,5%, seguida pela Soléia, cujas plantas tratadas produziram 19,6% mais que as controle (Tabela 2). O menor incremento foi observado nas cultivares Emeraude e Canelle, com diferenças em torno de 9% entre as plantas tratadas e controle. Nas demais cultivares houve mais de 12% de incremento na produção das plantas submetidas ao tratamento com o fungicida. No experimento anterior notou-se que tratamentos iguais com esse produto variaram com o nível de adubação, quando se empregou uma mesma cultivar de batata. Nesse experimento, observou-se que se o nível de adubação for fixado para diferentes cultivares, a reação dessas ao tratamento com esse produto também é diferenciada. Entretanto, de qualquer forma existe um ganho em produção nas plantas tratadas com fungicida (piraclostrobina + metiran). A cultivar Eole, que apresentou um dos maiores índices finais de incidência do PVY, teve o maior incremento de produção, ou seja, mais de 20%.

Considerando-se que esse produto empregado controla doenças fúngicas, em qualquer dos casos o seu emprego é bastante vantajoso. Entretanto, para o seu uso racional, existe a necessidade de se realizar mais estudos para determinar as condições ótimas para cada cultivar x níveis de adubação, para a obtenção do máximo rendimento possível, de cada uma delas.

TABELA 2. Efeito de fungicidas sobre a produção de oito cultivares de batata. São Gonçalo do Sapucaí –MG,

Cultivares	Produção Média por tamanho de Tubérculos (T/ha)						Produção T/ha	Ganho %
	Tratamento com CabrioTop®	Grandes	% Total	Médios	% do total	Pequenos		
Bailla	Tratadas	7,0 b*	31,8	13,3 b	60,5	1,71 b	22,0 **G b	12,7
	Não Tratadas	5,4 a	27,6	11,9 a	61,0	2,2 a	19,5 G a	
Canelle	Tratadas	9,0 a	45	9,9 b	49,5	1,1 b	20,0 D b	9,4
	Não Tratadas	9,4 a	51,7	8,4 a	45,9	0,5 a	18,3 D a	
Emeraude	Tratadas	7,7 b	49,3	7,2 a	46,2	0,7 a	15,6 B b	9,2
	Não Tratadas	6,3 a	43,8	7,2 a	50,3	0,8 a	14,3 B a	
Eole	Tratadas	13,5 b	69,6	4,9 a	25,3	1,0 a	19,4 D b	22,5
	Não Tratadas	10,2 a	64,6	4,7 a	29,7	0,9 a	15,8 C a	
Florice	Tratadas	10,2 b	73,9	3,1 a	22,4	0,5 a	13,8 A b	9,0
	Não Tratadas	9,1 a	72,2	3,0 a	23,8	0,5 a	12,6 A a	
Gredine	Tratadas	4,8 b	28,2	9,4 b	55,2	2,8 b	17,0 C b	13,4
	Não Tratadas	3,9 a	26,2	8,7 a	58,4	2,3 a	14,9 B a	
Opaline	Tratadas	15,2 b	66,4	7,1 b	31,0	0,6 b	22,9 F b	16,6
	Não Tratadas	11,2 a	56,8	7,7 a	39,1	0,8 a	19,7 E a	
Soleia	Tratadas	15,5 a	54,8	11,9 b	42,0	0,9 b	28,3 G b	19,6
	Não Tratadas	16,3 b	69,1	6,7 a	28,4	0,6 a	23,6 F a	

*Médias seguidas da mesma letra minúscula, na coluna, não diferem entre si, pelo Teste Scott Knott ao nível 5% de probabilidade, dentro da mesma cultivar.

**Médias seguidas de letras maiúsculas, na coluna, não diferem entre si, pelo Teste Scott Knott 5% de probabilidade, quando se compararam os 16 tratamentos. CV(%)= 4,73

6 CONCLUSÕES

- A disseminação do PVY e do PLRV na batata cultivar Cupido, nas parcelas tratadas e não tratadas com CabrioTop[®] (piraclostrobina + metiran) foi semelhante, mostrando que o produto não influenciou na disseminação desses vírus no campo.
- O CabrioTop[®] foi mais eficiente para induzir um aumento da produção de plantas de batata cultivar Cupido quando aplicado no sulco, induzindo também um pequeno incremento quando combinadas as aplicações no sulco + emergência, no nível de adubação de 2.500 kg ha.
- Quando se empregou adubação de 3.500 kg ha a aplicação de CabrioTop[®] induziu um maior incremento da produção de plantas de batata cultivar Cupido, quando aplicado após a emergência.
- As plantas de batata cultivar Cupido reagiram de modo diferente ao CabrioTop[®] quando estabelecidas em solos com diferentes níveis de adubação, mostrando uma interação entre o tipo de tratamento e o nível de adubação com NPK.
- O efeito do CabrioTop[®] sobre a produção de oito cultivares de batata foi variável, induzindo um ganho de produção em todas elas, que variou de 9,02 a 22,52%.
- As cultivares que apresentaram os maiores incrementos na produção foram a cultivar Eole, Soléia e Opaline. As que apresentaram os menores foram as cultivares Canelle, Emeraude e Florice, que produziram cerca de 9% a mais que as plantas não tratadas.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRIANUAL. **Anuário da Agricultura Brasileira**. São Paulo: FNP Consultoria, 2008. 502 p.

ANDRADE, E. R.; FIGUEIRA, A. R. Degenerescência em seis cultivares de batata (*Solanum tuberosum* L.) na região Sul de Minas Gerais. **Ciência e Prática**, Lavras, v. 15, p. 9-15, 1991.

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

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

BOKX, J. A. de. Biological properties. In: BOKX, J. A. de; WANT, van der (Ed.). **Viruses of potato and seed potato production**. 2. ed. Wageningen: Pudoc, 1987. p. 58-82.

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

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

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

COSTA, A. S. Moléstias de vírus da batata. **Boletim do Campo**, Campinas, n. 190, p. 68-83, 1965.

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

FAGAN, E. D. **A cultura da soja: modelo de crescimento e aplicação da estrobilurina piraclostrobina**. 2007. 83 p. Tese (Doutorado em Agronomia/Fitotecnia) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, SP.

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

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.

FOOD AGRICULTURE ORGANIZATION. **Food situation in Latin America and Caribbean**. Disponível em: <<http://www.fao.org/>>. Acesso em: 7 jul. 2008a.

FOOD AGRICULTURE ORGANIZATION. **World focus on potato**. Disponível em: <<http://www.fao.org/>>. Acesso em: 7 jul. 2008b.

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

GRIMM, E. L. **Efeito de diferentes níveis de irrigação na produtividade e ocorrência de requeima na cultura da batata**. 2007. 69 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Agrícola/Engenharia de Água e Solo) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS.

HERMES, S.; SEEHAUS, K.; KOEHLE, H. **A Strobirulin fungicide enhances the resistance of tobacco against tobacco mosaic virus and pseudomonas syringae pv. Tabaci**. **Journal Plant Physiology**, Stuttgart, v. 130, p. 120-127, 2002.

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

KÖEHLE, H.; GROSSMANN, K.; JABS, T.; GERHARD, M.; KAISER, W.; GLAAB, J.; CONRATH, U.; SEEHAUS, K.; HERMES, S. **Physiological effects of the strobilurin fungicide F 500 on plants**. In: HERMES, S.; SEEHAUS, K.; KÖEHLE, H. **A strobirulin fungicide enhances the resistance of tobacco against Tobacco mosaic virus and Pseudomonas syringae pv. tabaci**. **Journal Plant Physiology**, Stuttgart, v. 130, p. 120-127, 2002.

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

SAUTER, H.; STEGLICH, W.; ANKE, T. Strobilurins: evolution of a new class of active substances. **Angew Chemical International**, v. 38, p. 1328-1349, 1999.

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

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

VENANCIO, W. S.; RODRIGUES, M. A. T.; BEGLIOMINI, E.; SOUZA, N. L. Physiological effects of strobilurin fungicides on plants. **UEPG Ciências Exatas da Terra**, Ponta Grossa, v. 9, n. 3, p. 59-68, dez. 2003.

XIE, Z. X.; FAN, B. F.; CHEN, C. H.; CHEN, Z. X. An important role of an inducible RNA-dependent RNA polymerase in plant antiviral defense. **Proceedings Natl. Academy Science**, n. 98, p. 6516-6521, 2001.

CAPÍTULO 2

DETECÇÃO DOS VARIANTES GENÉTICOS PVY^{N-Wi} e NE-11 NO BRASIL

RESUMO

GALVINO, Suellen Bárbara Ferreira. **Deteção dos variantes genéticos do PVY^{N-Wi} e NE-11 no Brasil.** In: _____. **Efeito de fungicidas na produção de batata e na disseminação de vírus e deteção dos variantes genéticos PVY^{N-Wi} e NE-11 no Brasil.** 2008. Cap. 2, p. 21 - 42. (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG*.

O vírus Y da batata (*Potato virus Y* - PVY) tem mostrado uma grande capacidade de mutação e adaptação, de modo que muitos variantes genéticos, capazes de causar uma ampla diversidade de sintomas e com alta capacidade de disseminação, têm surgido nos últimos tempos. Com a constante importação de batata-semente pelo Brasil parece impossível evitar a introdução desses novos variantes em território nacional. Nesse trabalho, nove isolados de PVY, escolhidos entre diversos isolados que têm sido coletados e estudados no DFP-UFLA, sendo quatro pertencentes à estirpe necrótica comum e cinco pertencentes ao variante PVY^{NTN}, foram testados com *primers* que têm sido recentemente desenvolvidos para detectar variantes Wilga, NA e NE-11. Os isolados do tipo PVY^{NTN}, denominados PVY-AST e PVY-AGA foram provenientes do estado de São Paulo e os PVY-MON IP-MON e SGS-MO, bem como os do tipo PVY^N, o BRE-EM, LUM-CE, LAV-CL e MFE-AG, foram coletados em Minas Gerais. Os testes de RT-PCR com os quatro isolados PVY^N, empregando os *primers* específicos para o isolado Wilga, permitiram a amplificação de uma banda típica com 4.115pb, nos isolados LAV-CL e MFE-AG. Empregando-se o *primer* NA, foi possível amplificar uma banda de 648 pb nos isolados PVY-AST, PVY-AGA e PVY-MON. O *primer* NE, amplificou uma banda de 978 pb para os isolados PVY-AGA e PVY-MON. Provavelmente o isolado PVY-AST apresenta um outro tipo de variabilidade que apenas poderá ser verificado com o seqüenciamento completo do seu genoma. É a primeira vez que esses isolados de PVY são descritos no Brasil, e essa constatação demonstra novamente que o país está permitindo a entrada de todos os novos isolados de PVY que tem aparecido nos países exportadores de batata-semente.

Palavras-chave: NE-11, PVY^{N-Wi}, *Potato virus Y*, batata, RT-PCR

***Orientadora:** Antonia dos Reis Figueira – UFLA

ABSTRACT

GALVINO, Suellen Bárbara Ferreira. Detection of PVY^{N-Wi} and NE-11 genetic variants in Brazil. In:____. **Effect of fungicides on potato yield and virus spread and detection of the genetic variants PVY^{N-Wi} and NE-11 in Brazil.** 2008. Cap. 2, p. 21 - 42 (Dissertation in Phytopathology) – Federal University of Lavras, Lavras, MG*.

The *Potato virus Y* (PVY) has been shown great ability of mutation and adaptation, so that several genetic variants, which are able to induce a wide of symptoms diversity and with high dissemination capacity have been appearing in the last times. With the constant importation of potato seed by Brazil, it seems impossible to avoid the introduction of these new variants in the country. In this work, nine isolates of PVY, chosen among several virus isolates that have been collected and studied in the DFP-UFLA, were tested with *primers* which have been recently developed to detect variants Wilga, NA and NE-11. Three PNY^{NTN} (PVY-AST, PVY-AGA e PVY-MON) and four PVY^N isolates (BRE-EM, LUM-CE, LAV-CL e MFE-AG) were collected in Minas Gerais State and two PNY^{NTN} isolates were from São Paulo State-Brazil. The RT-PCR tests using *primers* specific for Wilga, allowed to amplify a 4.115 pb fragment in LAV-CL and MFE-AG isolates. Using the *primers* for NA a typical band with 648 pb were amplified in PVY-AST, PVY-AGA and PVY-MON isolates. The specific *primers* NE-11 amplified a 978pb band for the isolates PVY-AGA and PVY-MON. Probably the PVY-AST isolate presents another type of variability, what can be checked only by the complete sequencing of its genome. It is the first time that Wilga, NE-11 and NA isolates of PVY are described in Brazil, and this observation demonstrates again that the country is allowing the entry of all the new PVY isolates that have been appearing in the countries which export to potato seed this country.

Keywords: NE-11, PVY^{N-Wi}, *Potato virus Y*, potato, RT-PCR

***Adviser:** Professor: Antonia dos Reis Figueira - UFLA

1 INTRODUÇÃO

O *Potato virus Y* (PVY) tem se tornado progressivamente uma das viroses mais importantes para a bataticultura nacional e mundial, sendo responsável por prejuízos similares ou superiores aos causados pelo *Potato leafroll virus* (PLRV), na década de 90 (Figueira, 1999; Singh et al., 2008). Isso porque novas estirpes, de rápida disseminação no campo, têm sido introduzidas no país, através de importações de batata semente. Membro tipo gênero *Potyvirus*, família *Potyviridae*, o PVY possui um genoma constituído por um RNA de fita simples infectivo de, aproximadamente 9,7 Kb. Sua partícula é encapsulada, filamentosa e flexível com dimensões de 730nm de comprimento e 11 nm de diâmetro (Bokx & Huttinga, 1981; Shukla et al., 1994; Regenmortel, 2000).

As plantas infectadas com PVY reagem com uma série de sintomas bastante variáveis, refletindo a interação vírus-planta-meio ambiente e a grande variabilidade genética que ocorre dentro dessa espécie (Bokx & Piron, 1977; Hooker, 1981; Le Romancer & Nedellec, 1997). Muitos virologistas apontam os fenômenos de mutação, recombinação e associação de segmentos genômicos, bastante frequentes em vírus de RNA, como os responsáveis pelo surgimento de novas estirpes e variantes virais (Worobey & Holmes, 1999; Glais et al., 2002). As diferentes estirpes e variantes de PVY, já descritas, possuem pontos de recombinação específicos observados em seu genoma e características biológicas particulares (Worobey & Holmes, 1999). A estirpe comum PVY^O é capaz de induzir mosaico leve a intenso em plantas de fumo (*Nicotiana tabacum* L.) e batata, e desfolha em *Physalis floridana* (Sanchez & Grogan, 1970); a estirpe necrótica (PVY^N) causa necrose das nervuras nas plantas de fumo e não provoca desfolha em *Physalis*, enquanto que a estirpe PVY^C é causadora de necrose sistêmica “striple-streak” em cultivares de batata que possuem o gene

Nc (Bokx & Huttinga, 1981). Esta última é a estirpe com distribuição geográfica mais restrita, talvez devido ao fato de que alguns de seus isolados não são transmitidos via afídeo vetor limitando sua ocorrência (Hooker, 1981; Ellis et al., 1997; Blanco-Urgoiti et al., 1998).

Nos anos de 1940-50, nos países da América do Sul e Europa, um isolado de PVY surgiu causando sintomas drásticos de necrose das nervuras de fumo (Kahn & Monroe, 1963; Orlando & Silberschmidt, 1945; Singh et al., 2008). Algumas décadas depois, em 1980, isolados necróticos muito semelhantes apareceram associados com a chamada *potato tuber necrotic ringspot disease* (PTNRD) (Beczner et al., 1984; Kus, 1995; Kerlan & Le Romancer, 1999) e foram, então, classificados como a variante NTN da estirpe PVY^N (Le Romancer et al., 1994). Singh et al. (2008) em sua recente revisão cita que ainda não se conhece, de fato, qual é a seqüência viral ou domínio responsável pelo fenótipo necrótico nos tubérculos, o que dificulta a detecção molecular dos isolados de PVY^{NTN}, principalmente quando não há desenvolvimento da PTNRD nos tubérculos.

Uma segunda variante de PVY^N, detectada na cultivar Wilga em campos da Polônia também pode, eventualmente, causar necrose nos tubérculos de batata de cultivares sensíveis, agravando ainda mais o problema de detecção da variante PVY^{NTN}. Chrzanowska (1991, 1994) relata que a variante Wilga (PVY^{N-Wi}) na Polônia apresentava-se em altas concentrações exibindo disseminação elevada e sintomas relativamente mais suaves comparados com os demais isolados. Além disso, os isolados PVY^{N-Wi} foram incapazes de reagir com um anticorpo monoclonal testado, específico para PVY^N.

Outros isolados têm sido recentemente relatados. Lorenzen et al. (2006) estudaram alguns grupos de isolados de PVY^N e PVY^{NTN}, europeus e norte americanos, através de RT-PCR multiplex, dando aos isolados norte americanos o nome de NA. Entre os treze isolados norte americanos estudados por eles,

denominados de NA-PVY^N e NA-PVY^{NTN}, cinco permitiram a amplificação de uma banda características de NA-PVY^{NTN} com 328pb. Quando estes cinco isolados foram submetidos a uma nova reação de RT-PCR para confirmação desse resultado, por meio de outros *primers*, foi possível a amplificação de uma banda com 898pb a partir do genoma de quatro deles, mas não para o quinto, denominado de NE-11. Isso sugeriu a possibilidade de alguma modificação no genoma deste isolado. Dois anos depois, Lorenzen et al. (2008) realizaram o seqüenciamento completo de 4 genomas de PVY, incluindo o isolado NE-11. Os resultados mostraram que esse isolado possui um ponto de recombinação adicional não característico, que pode ser encontrado na região da CP/3'UTR de outros genomas de PVY, podendo ter surgido a partir da divergência de algum deles. Desta forma os autores sugerem que o isolado NE-11 é um novo genótipo molecular (variante) do grupo PVY^N, sendo intermediário entre os já descritos PVY^N e o PVY^{NA-N/NTN}.

As técnicas biológicas e sorológicas, utilizando anticorpos policlonais, para a identificação e caracterização de isolados virais não são suficientes para a distinção da estirpe N e nem das variantes NTN e N:O ou Wilga do vírus Y. Nestes casos, apenas a utilização de testes sorológicos com anticorpos monoclonais (Shukla et al., 1994) e as reações de RT-PCR com *primers* específicos do genoma aliadas ao seqüenciamento de regiões que contenham os pontos de recombinação característicos podem fazer a identificação e caracterização completa dessas variantes (Booham et al., 2002; Lorenzen et al., 2006, 2008; Singh et al., 2008).

Estudos realizados no DFP/UFLA por Costa (2008), Rabelo Filho (2008) e Camargos (2008-dados ainda não publicados) relataram a presença de diversos isolados da estirpe PVY^N e do variante PVY^{NTN}, em campos produtores de batata do estado de Minas Gerais. O seqüenciamento e a comparação das seqüências, do fragmento genômico do gene do capsídeo desses isolados, com

seqüências disponíveis no GenBank, mostraram níveis de identidade bastante altos com as variantes Wilga e NE-11. Entretanto, embora haja uma alta probabilidade desses isolados brasileiros serem do mesmo tipo, somente o seqüenciamento do genoma completo do vírus, ou mesmo a utilização de *primers* específicos, poderia permitir uma correta identificação dos mesmos. Assim sendo, nesse trabalho foram utilizados *primers* específicos, recentemente descritos na literatura (Lorenzen *et al.*,2008; Glais *et al.*,2005), com a finalidade de verificar a identidade de nove isolados virais atípicos, anteriormente detectados e estudados no DFP/UFLA, tendo cinco deles sido classificados como PVY^{NTN}, e quatro como PVY^N.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Descrição dos isolados estudados

Os isolados estudados se encontram discriminados na Tabela 1, tendo sido originalmente coletados em diversas regiões do estado de Minas Gerais, e mantidos em ultras-freezers, ou desidratados, sendo quinzenalmente inoculados mecanicamente em fumo (*Nicotiana tabacum*) cvs. Turkish e Turkish NN, tanto para utilização nos testes de laboratório quanto para re-armazenamento e manutenção do inóculo. Os isolados denominados PVY-AST, PVY-AGA e PVY-MON foram classificados como PVY^{NTN} e causam sintomas severos em plantas de batata das cultivares Asterix, Ágata e Monalisa, caracterizados por enrolamento da parte apical da planta, sendo por isso, denominados de “broto crespo”. Os isolados IP-MON e SGS-MO, detectados em Monalisa, em de lavouras de Ipuina e São Gonçalo do Sapucaí, respectivamente, são ambos do tipo PVY^{NTN} mas o segundo causa sintomas mais severos de nanismo em plantas de fumo. Os isolados BRE-EM, de Bom Repouso, detectado na cultivar Emeraude e o LUM-CE de Luminárias, detectado na cultivar Caesar, foram

classificados como PVY^N, e são capazes de induzir sintomas necróticos bastante severos em plantas de fumo. Por outro lado, o LAV-CL, encontrado infectando naturalmente um clone do programa de melhoramento genético da UFLA, em Lavras-MG e o MFE-AG, encontrado infectando batata da cultivar Ágata em Maria da Fé, apesar de também serem classificados como PVYN, induzem sintomas necróticos bem mais fracos em plantas de fumo, em comparação com os induzidos pela estirpe necrótica típica.

Tabela 1. Origem e denominação dos isolados do *Potato virus Y* (PVY) estudados. Lavras, 2008.

ISOLADOS Origem	Código	CULTIVAR	TRABALHO DE REFERÊNCIA
Lavras	LAV-CL	Clone	Rabelo Filho (2008)
Luminárias	LUM-CE	Cesar	Rabelo Filho (2008)
Maria da Fé	MFE-AG	Ágata	Rabelo Filho (2008)
Bom Repouso	BRE-EM	Emeraude	Rabelo Filho (2008)
Ipuiuna	IP-MON	Monalisa	Camargos – Não publicado
São Gonçalo Sapucaí	SGS-MO	Monalisa	Camargos – Não publicado
Vargem Grande do Sul	PVY-AST	Asterix	Costa (2008)
Vargem Grande do Sul	PVY-MON	Monalisa	Costa (2008)
Ipuiuna	PVY-AGA	Ágata	Costa (2008)

2.2 Extração do RNA total

A extração do RNA total foi realizada pelo método “Pine Tree RNA Isolation” (Chang et al., 1993), a partir de folhas de fumo infectadas com os diferentes isolados. Para cada grama de tecido macerado em nitrogênio líquido foram adicionados 5 ml de tampão de extração pré-aquecido a 65°C (2% PVP, 100mM Tris-HCL pH8, 25 mM EDTA, 2M NaCl, 0,5g/L espermidina, 2% beta-mercaptoetanol), fazendo-se a homogeneização do extrato obtido por meio de vórtex e inversão dos microtubos. Em seguida foi adicionado igual volume de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1), fazendo-se uma agitação em vórtex e

centrifugação a 12000rpm, 10 minutos, por duas vezes. Após a coleta do sobrenadante, foi adicionado LiCL 10M na proporção de ¼ v/v. O RNA foi precipitado overnight à temperatura de 4°C e centrifugado a 12000rpm, por 20 minutos. O pellet foi dissolvido em SSTE (1M NaCl, 0,5% SDS, 10mM Tris-HCl ph 8, 1mM EDTA ph 8) e submetido a mais uma extração com igual volume de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1). Após essa etapa precipitou-se o RNA adicionando-se 2 volumes de etanol absoluto, incubando-se por 30 minutos à temperatura de -70°C e centrifugando-se a 12.000 rpm por 20 minutos. Finalmente, fez-se a lavagem com etanol a 75%, secagem do precipitado à vácuo e ressuspensão em 25µl de água ultra pura com DEPC. O RNA total extraído foi analisado em gel de agarose 0,7%.

2.3 Reação de RT-PCR

Para a confirmação e separação dos isolados PVY^N dos PVY^{NTN} foi utilizada uma combinação dos *primers* descritos por Booham et al. (2002). Para a identificação de possíveis variantes desses isolados foram utilizados um par de *primers* específicos para PVY^{N-Wi}, descrito por Glais et al. (2005), e dois pares de *primers* específicos para NE-11, descritos por Lorenzen et al. (2008)(Tabela 2).

Tabela 2. Sequência dos *primers* empregados nas reações de RT-PCR

<i>Primers</i>		Sequência (5' - 3')	Banda
PVY ^N PVY ^{NTN}	O-9295R	TGTACTGATGCCACCGTCGAAC	609pb 280pb
	O-8687F	TCTGGRACACATACWGTRCCRA	
	N-8687F	TCTGGAACTCAYACTGTGCCAC	
PVY ^{N-Wi}	W2253F	AATACTAGTCGATCACGAAACGCAGACAT GC	4115pb
	W6343R	CCCATATTCAACAGATACTTTTCAG C	
PVY ^{N-NE11}	NE(N)1979F	TCGTAATAGGTAATAGTGGCGAC	648pb
	NE(NA)2627 R	CACAACCTTCACTGCAAGC	
	NE(11)8049F	GCGTTCTTTGTTAATGGCGAC	978pb
	NE(11)9026R	GCATTTTCAACAATCGGCTTGA	

2.4 Síntese do cDNA

A transcrição reversa foi feita empregando-se 0,8µL M-MLV RT (Promega) e 0,5 µg de *primer* reverse de cada combinação exposta na Tabela1. O volume total da reação foi de 20µL, contendo 250mM TrisHCl (ph8.3 a 25°C), 375mM KCl, 15mM MgCl₂, 50mM DTT e água ultra pura com DEPC. Os tubos foram incubados a 42°C por 60 minutos e em seguida a 95°C por 5 minutos, e colocados imediatamente em recipiente com gelo.

2.5 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

A reação de PCR empregou a GoTaq[®] Flexi DNA Polymerase (Promega). A reação de 50µL continha 25mM MgCl₂ (25 mM), 10mM de cada dNTPs, 0,1-1,0 µM dos *primers*, inclusive no triplex realizado utilizando os *primers* descritos por Booham et al. (2002) (Tabela2), água ultra pura com DEPC e cerca de 0,5µg/50µl de cDNA. O ciclo de desnaturação inicial empregado foi o recomendado pelo fabricante da enzima (95°C por 2 minutos) e

os ciclos seguintes foram os mesmos empregados por Booham et al. (2002). Nas amplificações com os *primers* para NE-11 foram utilizados as temperaturas sugeridas por Lorenzen et al. (2008) e para as amplificações com os *primers* da variante Wilga as utilizadas no trabalho de Glais et al. (2005).

Os produtos obtidos dessa reação de amplificação do DNA foram então analisados em gel de agarose a 0,7% corado com GelRed Nucleic Acid Gel Stain.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As amplificações obtidas com os *primers* descritos por Booham et al. (2002), na discriminação dos isolados, permitiram a amplificação de uma banda de 280 pb, típica para a estirpe necrótica PVY^N, e uma banda de 609pb (Figura 1), típica do variante PVY^{NTN}. Dessa forma foi confirmada a identidade dos isolados BRE-EM, LUM-CE, LAV-CL e MFE-AG, como PVY^N e os demais como pertencentes à PVY^{NTN}. Quando esses quatro isolados foram submetidos a RT-PCR com os *primers* específicos para o isolado Wilga, os isolados LAV-CL e MFE-AG permitiram a amplificação de uma banda típica com 4.115pb, enquanto que os dois outros não geraram nenhuma amplificação (Figura 2). Isso está de acordo com o descrito por Chrzanowska (1991, 1994) e Glais et al. (2005) que observaram que esses isolados induzem, em fumo, sintomas necróticos bem mais fracos que os isolados da estirpe necrótica comum.

A primeira vez que um isolado de PVY com essas características foi detectado no Brasil, foi na região de Maria da Fé, onde as cultivares Achat e Baraka eram muito plantadas (Figueira, 1995, 1999; Figueira & Pinto, 1995; Figueira et al., 1996). Esse isolado de PVY foi introduzido no Brasil por meio de sementes da cultivar Achat, importadas da Alemanha, e causou um grande problema para os agricultores, o que levou essa cultivar a ser gradativamente

descartada (Figueira, 1999; Moraes & Figueira, 1999; Geraldino et al., 2006). Atualmente essa cultivar praticamente não é mais plantada (Geraldino et al., 2006). Pelo que se pode observar esse isolado continua a infectar os campos de batata em Maria da Fé, provocando altos índices de infecção. As sementes que continham esse isolado apresentavam 50% de incidência e eram sementes próprias, não certificadas, de um renomado produtor da região.

Quando os demais isolados foram testados com o *primer* NA, os isolados PVY-AST, PVY-AGA e PVY-MON permitiram a amplificação de uma banda de 648pb, mostrando a semelhança entre esses e os isolados americanos (Figura 3). Entretanto, quando esses mesmos isolados foram testados com os *primers* para o isolado NE, apenas o PVY-AGA e PVY-MON permitiram a amplificação de uma banda típica com 978 pb, bastante robusta, indicando que o anelamento dos *primers* deve ter sido específico (Figura 4). Em todas as repetições realizadas, a RT-PCR com o PVY-AST foi negativa. Apenas em uma das reações houve o aparecimento de uma banda bastante fraca (Figura4 - n°5), indicando que o anelamento foi inespecífico, ou seja, essa região deve ser diferente do PVY-AGA e do PVY-MON. Os isolados IP-MON e SGS-MO não permitiram amplificação de bandas com nenhum desses dois pares de *primer*.

Esses resultados são semelhantes ao encontrado para o NE, em 2006, quando a amplificação de uma determinada região não foi obtida como seria o esperado para isolados pertencentes à estirpe PVY^{NTN} norte-americana, sendo assim, a não amplificação da banda específica do NE-11 no isolado PVY-AST abre um leque de possibilidades em relação a sua verdadeira identidade e à possibilidade da geração de novos pontos de recombinação e mutação que culminarão em novas derivações divergentes.

Comparando-se as seqüências de nucleotídeos e aminoácidos da região do gene do capsídeo, obtidas por Rabelo Filho (2008), Costa (2008) e Camargos (dados não publicados) observa-se que os isolados PVY-AST, PVY-AGA e

PVY-MON possuem os mesmos nucleotídeos na posição 434 a 455 , que é a região para a qual foi desenhado o primer para o isolado DQ157180, classificado como NE-11. No entanto, a amplificação da banda característica do NE-11 não ocorreu para o isolado PVY-AST, provavelmente porque esse isolado, apesar de ser parecido com os dois outros, deve possuir mudanças nos nucleotídeos próximos a posição 8049 (considerando-se o genoma completo do vírus), para a qual foi desenhado o segundo primer, de modo que esse não pode ser anelado, explicando a ausência da banda. O seqüenciamento completo do genoma e o estudo de pontos de recombinação desses três isolados são necessários para esclarecer esse fato. Baseado nos dados expostos acima é possível afirmar a que essa variante, denominada NE-11, está presente no Brasil nos estados de São Paulo e Minas Gerais.

A árvore filogenética construída com base na seqüência de nucleotídeos da capa mostrou a separação dos isolados em dois principais clados, sendo o primeiro dividido em dois subgrupos e o terceiro formado apenas pelo isolado P-MON, que ficou separado de todos os demais. No primeiro clado, os isolados PVY-AGA, PVY-MON e PVY-AST se agruparam com o isolado americano DQ157180, que é o denominado NE-11(Figura 5), sendo que o PVY-AGA foi o que mostrou uma maior proximidade com este. Dentro desse clado o SGS-MO ficou isolado numa segunda subdivisão. No segundo subgrupo, se agruparam os demais isolados, que são todos PVY^N.

A árvore filogenética, construída com base nas seqüências de aminoácidos mostrou a separação dos isolados em três principais clados. O primeiro clado, se subdividiu em dois subgrupos, sendo que o primeiro foi constituído pelos isolados do tipo PVY^N, e o segundo pelo isolado SGS-MO. No segundo clado agruparam-se os isolados classificados como NE-11, sendo que o PVY-AGA e DQ157180 mostraram novamente um relacionamento filogenético

bastante próximo. O isolado PVY-AST, dessa vez, se separou de todos os demais, o que aconteceu de novo com o IP-MON (Figura 6).

O fato de o Brasil importar continuamente sementes de outros países tem propiciado a introdução de novas variantes do PVY no país . Atualmente, com a nova lei de sementes e mudas, que permite ao produtor importar e produzir sementes próprias fora do sistema de certificação, essa introdução tem se intensificado. Isso não deixa de ser um retrocesso para o setor de bataticultura nacional, que se torna cada vez mais uma atividade de risco, pela incerteza da sua rentabilidade.

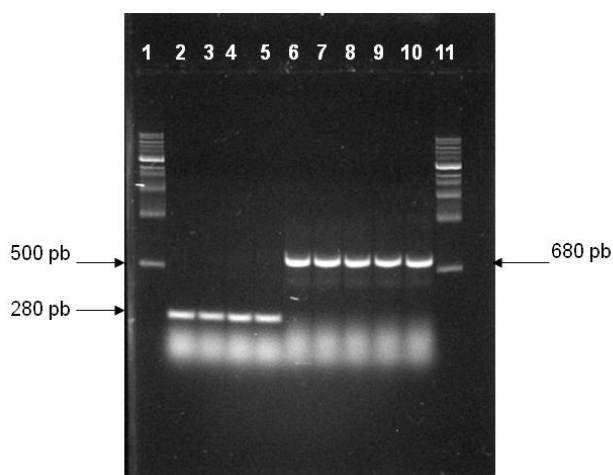


FIGURA 1. Análise eletroforética das bandas amplificadas com os *primers* de Booham et al. (2002). 1.Marcador 1kbLadder; 2.BRE-EM; 3.LAV-CL; 4.LUM-CE; 5.MFE-AG; 6.PVY-AGA; 7.PVY-AST; 8.PVY-MON; 9.IP-MON; 10.SGS-MO; 11.Marcador 1kb Ladder. Lavras-MG,2008.

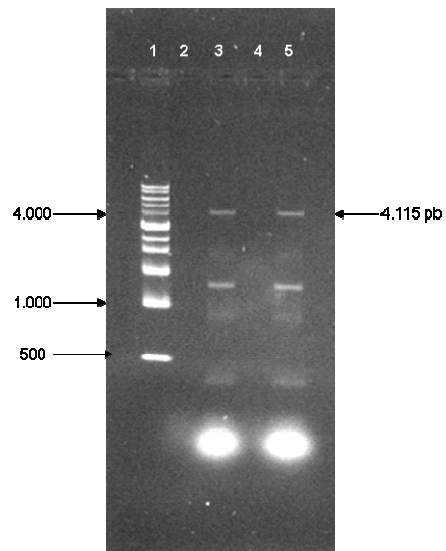


FIGURA 2. Análise eletroforética das bandas amplificadas com os *primers* de Glais et al. (2005). 1. Marcador 1kb Ladder; 2. BRE-EM; 3. LAV-CL; 4. LUM-CE; 5. MFE-AG.

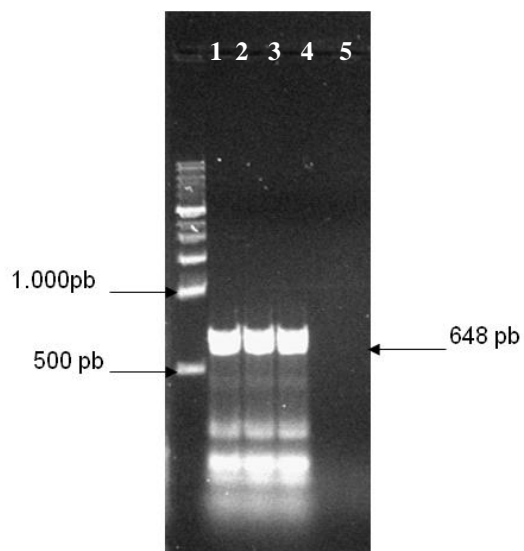


FIGURA 3. Análise eletroforética das bandas amplificadas com os *primers* NE(N)1979 e NE(NA)2627, descritos por Lorenzen et al. (2008). 1. Marcador 1kb Ladder; 2. PVY-AGA; 3. PVY-AST; 4. PVY-MON; 5. IP-MON; 6. SGS-MO.

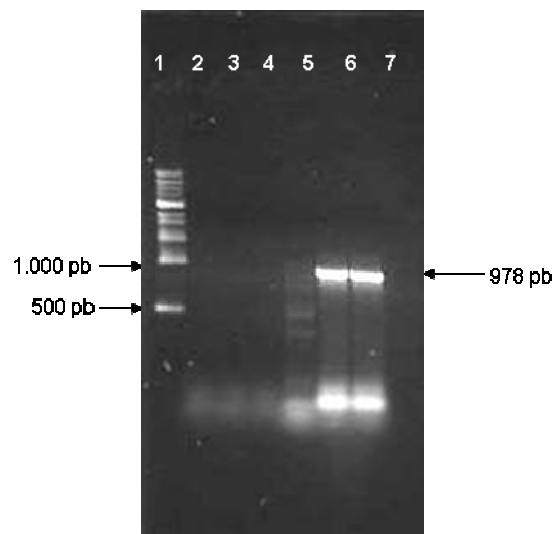


FIGURA 4. Análise eletroforética das bandas amplificadas os *primers* NE-11 descritos por Lorenzen et al. (2008). 1.Marcador 1kb Ladder; 2. IP-MON; 3. SGS-MON; 4. PVY-AST; 5. PVY-AST2; 6. PVY-AGA; 7. PVY-MON. Lavras-MG,2008.

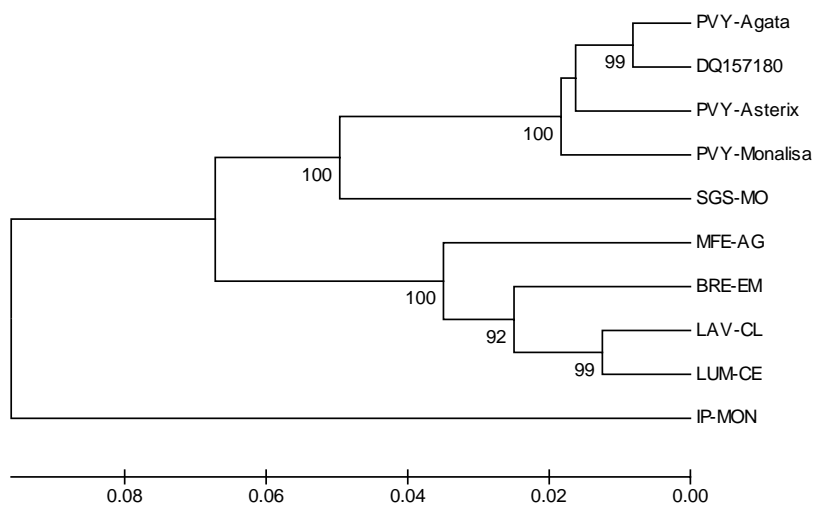


FIGURA 5. Árvore filogenética construída com base na seqüência de nucleotídeos dos isolados estudados. Os valores de bootstrap foram obtidos pelo programa MEGA e UPGMA, com 2.000 repetições.

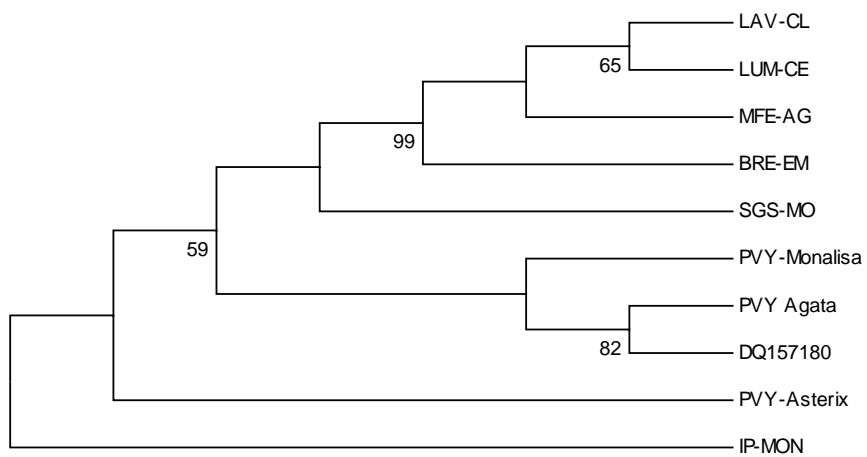


FIGURA 6. Árvore filogenética construída com base na seqüência de aminoácidos dos isolados estudados. Os valores de bootstrap foram obtidos pelo programa MEGA e UPGMA, com 2.000 repetições.

4 CONCLUSÕES

- Os isolados LAV-CL e MFE-AG foram classificados como PVY^{N-Wi}, com base em sintomas induzidos em plantas de fumo e a amplificação de banda específica por RT-PCR utilizando-se *primers* descritos na literatura.

- Os isolados necróticos PVY-AST, PVY-AGA e PVY-MON foram classificados como PVY-NA com base em reações de RT-PCR utilizando-se *primers* específicos para esse isolado Norte americano, mas apenas os isolados PVY-AGA e PVY-MON amplificaram a banda específica para o isolado NE-11, indicando diferenças genéticas entre esses e o PVY-AST.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

BLANCO-URGOITI, B.; TRIBODET, M.; LECLERE, S.; PONZ, F.; PEREZ DE SAN ROMAN, C.; LEGORBURU, F. J.; KERLAN, C. Characterization of potato potyvirus Y (PVY) isolates from seed potato batches: situation of the NTN, Wilga and Z isolates. **European Journal Plant Pathology**, v. 104, p. 1-9, 1998.

BOKX, J. A. de; HUTTINGA, H. **Potato vírus Y**. Kew: Commonw. Mycology Institute, 1981. (Descriptions of plant viruses, 242).

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

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

CHANG, S.; PURYEAR, J.; CAIRNEY, J. A simple and efficient method for isolation RNA from Pine Trees. **Plant Molecular Biology Report**, Athens, v. 11, p. 113-116, 1993.

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

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

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

ELLIS, P.; STACE-SMITH, R.; VILLEERS, G. de. Identification geographic distribution of serotypes of potato virus Y. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 81, n. 5, p. 481-484, 1997.

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

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

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

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

GERALDINO, P. S.; BARBOSA, C. R.; FIGUEIRA, A. R.; FERREIRA, A. F. Incidência de vírus em batata semente no estado de Minas Gerais. In: CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UFLA-CIUFLA, 19.; SEMINÁRIO DE AVALIAÇÃO DO PIBIB/CNPq, 19.; SEMINÁRIO DE AVALIAÇÃO DO PIBIB/FAPEMIG, 19., 2006, Lavras, MG. **Anais...** Lavras, MG: UFLA, 2006. p. 306.

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

GLAIS, L.; TRIBODET, M.; KERLAN, C. Specific detection of the PVY^{NW} variant of *Potato virus Y*. **Journal of Virological Methods**, v. 125, p. 131-136, 2005.

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

KAHN, R. P.; MONROE, R. O. Detection of tobacco vein necrosis strain of *Potato virus Y* in *Solanum cardenassi* and *S. andigenum* introduced into the United States. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 53, p. 1356-1359, 1963.

KERLAN, C.; LE ROMANCER, M. Potato tuber necrotic ringspot disease. In: EAPR MEETING, VIROLOGY SECTION, 1999, Vitoria-Gasteiz, Spain. **Proceedings...** Vitoria-Gasteiz, 1999. p. 77-79.

KUS, M. The epidemic of the tuber necrotic ringspot strain of *Potato virus Y* (PVY^{NTN}) and its effect on potato crops in Slovenia. In: EAPR VIROLOGY SECTION MEETING BLED, 9., 1995, Bled, Slovenia. **Proceedings...** Bled, 1995. p. 159-160.

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

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

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

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

MORAES, F. H. R.; FIGUEIRA, A. R. Estudo comparativo de algumas propriedades de cinco isolados do vírus Y da batata. **Summa Phytopathologica**, Jaguariúna, v. 25, n. 2, p. 117-124, 1999.

ORLANDO, A.; SILBERSCHMIDT, K. M. Estudo sobre a transmissão de doenças de vírus de solanáceas “necrose das nervuras” por afídeos e algumas relações entre esse vírus e seu principal vetor. **Arquivo do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 16, p. 133-152, 1945.

RABELO FILHO, F. A. C. **Caracterização biológica e molecular de isolados de *Potato virus Y* (PVY) em Minas Gerais e verificação de resíduos em tubérculos de batata quando feito o controle do inseto vetor.** 2008. 103 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

REGENMORTEL, M. van. **Virus taxonomy**: genus carlavirus. San Diego: Academic, 2000. 384 p.

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

SINGH, R. P.; VALKONEN, J. P. T.; GRAY, S. M.; BOONHAM, N.; JONES, R. A. C.; KERLAN, C.; SCHUBERT, J. Discussion paper: the naming of Potato virus Y strains infecting potato. **Archive of Virology**, v. 153, p. 1-13, 2008.

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