



UNIVERSIDADE FEDERAL DE LAVRAS

**ASPECTOS BIOLÓGICOS E MOLECULARES  
DO VÍRUS S (*Potato virus S* - PVS) DA  
BATATA**

**ELLEN NOLY BARROCAS**

**2005**

**ELLEN NOLY BARROCAS**

**ASPECTOS BIOLÓGICOS E MOLECULARES DO VÍRUS S  
(*Potato virus S* – PVS) DA BATATA**

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

Orientadora

Profª. Dra. Antonia dos Reis Figueira

LAVRAS  
MINAS GERAIS - BRASIL  
2005

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

Barrocas, Ellen Noly

Aspectos biológicos e moleculares do vírus S (*Potato virus S* – PVS) da batata / Ellen Noly Barrocas -- Lavras : UFLA, 2004.

90 p. : il.

Orientadora: Antonia dos Reis Figueira.

Dissertação (Mestrado) – UFLA.

Bibliografia.

1. Batata-*Solanum tuberosum* - doença. 2. Vírus S da batata - PVS. 3. Diagnose. 4. Teste biológico - Interação PVS, PVY. 5. Técnica molecular: RT-PCR - Clonagem - Sequenciamento. 6. Análise filogenética - capa protéica. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

**CDD-635.2198.**

**ELLEN NOLY BARROCAS**

**ASPECTOS BIOLÓGICOS E MOLECULARES DO VÍRUS S  
(*Potato virus S* – PVS) DA BATATA**

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

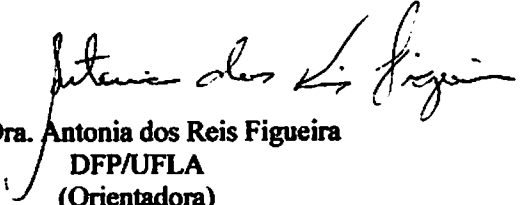
**APROVADA em 25 de Fevereiro de 2005**

**Prof. PhD. César Augusto Brasil P. Pinto**

**UFLA**

**Prof. Dr. Ricardo Magela de Souza**

**UFLA**

  
**Prof. Dra. Antonia dos Reis Figueira**  
**DFP/UFLA**  
**(Orientadora)**

**LAVRAS  
MINAS GERAIS - BRASIL**

## 1 INTRODUÇÃO GERAL

A batata (*Solanum tuberosum* L.) é uma hortaliça de grande expressão na agricultura, ocupando o segundo lugar em valor nutritivo, proteínas, calorias, aminoácidos, sais minerais e vitaminas (Vechi & Hirano, 1984). É largamente cultivada no território nacional, em diversas latitudes, até três vezes por ano. A área plantada no ano de 2004 foi de quase 136 mil hectares, com produção de 2,84 milhões de toneladas (AGRIANUAL, 2005).

Diversos fatores podem afetar a produção da batata, destacando-se, entre eles, a infecção por patógenos diversos. O fato dessa planta ser propagada vegetativamente facilita a transmissão desses patógenos por meio das sementes, provocando a sua degeneração após poucas multiplicações em campo (Costa, 1948; Cupertino & Costa, 1970; Hooker, 1981; Bokx, 1987; Souza Dias & Costa, 1984; Figueira et al., 1985). O acúmulo de vírus tem sido apontado como o principal fator responsável pela degenerescência da batata-semente, resultando na redução do número e no tamanho dos tubérculos, o que afeta significativamente a sua produtividade (Santos Costa, 1965; Bokx, 1987).

Atualmente, já foram detectados mais de 40 vírus infectando a batata no mundo (Beemster & De Bokx, 1987). Felizmente, apesar de muitos deles já terem sido detectados nas regiões produtoras brasileiras, a maioria não representa risco potencial para o Brasil (Souza Dias et al. 1995).

Antes de 1995, o vírus do enrolamento da folha (*Potato leafroll virus-PLRV*) era considerado o único causador de perdas na bataticultura brasileira (Costa, 1948; Cupertino & Costa, 1970; Souza Dias et al., 1984; Souza Dias et al. 1990). A partir daí, com a introdução de uma estirpe mais agressiva do vírus Y da batata (*Potato vírus Y-PVY*) em batata-semente cultivar Achat, importada da Europa, esse vírus passou a ser considerado também importante (Figueira et al.,

**Ao meu filho Lourenço**

**À minha mãe, Mariza**

**Às minhas, irmãs Elaine, Aline, Laila e Helgan,**

**Aos meus sobrinhos Ana, Cláudio, Isabel, Lú, Nicolau,**

**e aos novos bebês que estão chegando,**

**pelo belo exemplo que tenho de união**

**OFEREÇO**

## AGRADECIMENTOS

À vida, pela nossa existência.

À Universidade Federal de Lavras, pela oportunidade de realização deste trabalho.

Ao Instituto Mineiro de Agropecuária, pela oportunidade de realização do mestrado em Fitopatologia.

À professora Antonia dos Reis Figueira, pela orientação e ensinamentos.

Aos professores da Fitopatologia, pelos conhecimentos transmitidos.

A todos os alunos e funcionários, pela amigável convivência e bons momentos compartilhados em especial às meninas da faxina (Marli, Nice e Cidinha).

Aos amigos do Centro de Indexação, Carzinho, Denise, Antonio Carlos e Sidney, por me permitirem trabalhar com pessoas de bom coração.

Aos amigos da Bacteriologia, pelo bom convívio e apoio.

Aos amigos que me acompanharam durante esta longa caminhada: Renata, Alê, Léo, Fabiola, Cássia, Miriam, Fred, Viviane, Gatinho, Flavinho, Oneida e Vanúzia.

Ao Lobão, pela paciência e amor.

A Graciele e toda sua família, por cuidar da minha "jóia" enquanto eu desenvolvia meus trabalhos.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para o êxito deste trabalho.

## SUMÁRIO

	<b>Página</b>
RESUMO .....	i
ABSTRACT .....	iii
<b>CAPÍTULO 01 – Aspectos biológicos e moleculares do vírus S (<i>Potato virus S</i> – PVS) da batata</b>	<b>1</b>
1 INTRODUÇÃO GERAL .....	2
2 REFERENCIAL TEÓRICO .....	5
2.1 Batata: importância da cultura e principais doenças .....	5
2.2 <i>Potato virus S</i> (PVS): Características gerais da partícula .....	7
2.3 Transmissão e disseminação do PVS .....	10
2.4 Aspectos biológicos e moleculares .....	15
2.5 Ocorrência .....	18
3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	20
<b>CAPÍTULO 02 – Sintomas provocados pelo <i>Potato virus S</i> (PVS) em hospedeiras e sua interação com o <i>Potato virus Y</i> (PVY) em plantas de batata.</b>	<b>27</b>
1 RESUMO.....	28
2 ABSTRACT .....	29
3 INTRODUÇÃO .....	30
4 MATERIAL E MÉTODOS .....	33
4.1 Origem dos isolados .....	33
4.2 Manutenção do inóculo viral .....	34
4.3 Investigação de sintomatologia em hospedeiros .....	34
4.4 Investigação dos sintomas do PVS associados aos do PVY em	35



plantas de batata.....	35
4.5 Teste sorológico DAS-ELISA .....	36
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	37
6 CONCLUSÕES.....	46
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	47
<b>CAPÍTULO 03 – Característica moleculares do gene capa protéica de</b>	<b>50</b>
<b>um isolado do <i>Potato virus S</i> (PVS) no Brasil</b>	
1 RESUMO .....	51
2 ABSTRACT .....	52
3 INTRODUÇÃO .....	53
4 MATERIAL E MÉTODOS .....	55
4.1 Origem e manutenção do isolado .....	55
4.2 Extração do RNA total .....	56
4.2.3 Transcrição reversa e PCR .....	56
4.3 Clonagem e sequenciamento .....	57
4.4 Análise da seqüência .....	59
5 RESULTADO E DISCUSSÃO. ....	60
6 CONCLUSÕES .....	63
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS. ....	64
ANEXOS .....	67

## RESUMO

BARROCAS, Ellen Noly. Aspectos biológicos e moleculares do vírus S (“*Potato Virus S*”-PVS) da batata. 2005. 88p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.<sup>1</sup>

Cinco isolados de *Potato virus S* (PVS) provenientes de sementes importadas (ATL, CAL.R., CHIP) e nacionais (DUV) foram inoculados mecanicamente em nove espécies de plantas, em dois períodos do ano (maio e dezembro), a fim de investigar reação deles a esse vírus. Para estudar o tipo de interação do PVS com o *Potato virus Y* (PVY), em plantas de batata com infecções mistas, hastes infectadas de batata cv. Duvira foram primeiramente enxertadas em plantas das cultivares Atlantic, Agata e Monalisa infectadas com uma estirpe necrótica do PVY. Em seguida, tubérculos produzidos por plantas sadias, infectadas com PVY, PVS e PVS+PVY, das cultivares Ágata e Monalisa, foram submetidos a forçamento de brotação e plantados para a observação dos sintomas secundários nas plantas. Foram feitos também a clonagem e o sequenciamento de um fragmento genômico, correspondente ao gene da capa protéica (CP) do isolado IDA.R, para estudar as suas características moleculares. Entre as plantas inoculadas mecanicamente, somente *C. quinoa* e *C. amaranticolor* foram suscetíveis a todos os isolados de PVS, reagindo com lesões locais cloróticas. Plantas *G. globosa*, *P. vulgaris*, *N. rustica*, batata cv. Ágata, *A. tenella*, *D. stramoniu* e *N. tabacum* (cv. Turkish NN), não mostraram sintomas quando inoculadas, em ambas épocas e foram ELISA negativas. De modo geral, as plantas apresentaram mesma reação ao PVS nas duas épocas do ano, com exceção de *C. amaranticolor* que não apresentou sintomas quando foi inoculada com ATL e CAL.R no mês de dezembro. Plantas de tomate (*Lycopersicon esculentum*) cv. Santa Clara reagiram com arroxamento internerval, apresentando anéis arroxeados na face abaxial, quando foram inoculadas com os isolados CAL.R, CHIP e IDA.R. Esse sintoma ainda não havia sido descrito na literatura. As plantas de batata infectadas com o PVY, quando foram enxertadas com as hastes infectadas com o PVS, mostraram um considerável aumento na severidade dos sintomas, caracterizado pelo aparecimento de um mosaico mais intenso, enrugamento e diminuição da área foliar, nas três cultivares de batata testadas. Os sintomas secundários observados nas plantas provenientes dos tubérculos infectados foram mais intensos nas plantas infectadas com PVS + PVY, indicando interação entre os dois vírus. A cv. Monalisa com infecção mista, além de um mosaico mais intenso mostrou severa deformação foliar, o que não aconteceu nas plantas infectadas somente com o PVS ou PVY. No alinhamento de nucleotídeos a menor identidade entre o isolado estudado e os

do banco de genes foi de 80% com o isolado AF493951 proveniente da Inglaterra e D00461 e a maior identidade foi de 95% com o isolado Y079209, (isolado Fujian) da China. No alinhamento de aminoácidos, a maior identidade foi de 100% com o isolado AF493950, da Inglaterra e as menores identidades foram com os isolados AF493951 (93%) e D00461(94%), ambos PVS<sup>A</sup>.

## ABSTRACT

BARROCAS, Ellen Noly. **Biological and molecular aspects of *Potato Virus S* (PVS)**. 2005. 88p. Dissertation (Master Program in Phytopathology) – Federal University of Lavras, Lavras, MG.<sup>1</sup>

Five *Potato virus S* (PVS) isolates, coming from imported (ATL, CAL.R., CHIP) and national seeds (DUV), were mechanically inoculated in nine plant species in two year seasons (May and December), in order to investigate the host reaction and susceptibility. It was also investigated the interaction between PVS and PVYY (*Potato virus Y*) in potato plants with mixed infections. Therefore, stems of infected plants cv. Duvira were firstly grafted in plants of cv. Atlantic, Ágata e Monalisa infected with PVY necrotic strain (PVY<sup>N</sup>). Later on, the potato tubers from Ágata and Monalisa cultivars, with no viruses and with single PVY, single PVS and with PVS + PVY, were submitted to dormancy breaking and planted to investigate the secondary symptoms. To analyze the coat protein gene (CP) of IDA.R PVS isolate, one genomic fragment containing 894pb was amplified, cloned and sequenced. Among the plants mechanically inoculated only *Chenopodium quinoa* and *C. amaranticolor* were susceptible to all the PVS isolates, and showed chlorotic local lesions. The plants of *Gomphrena globosa*, *Phaseolus vulgaris*, *Nicotiana rustica*, Batata cv. Ágata, *Althernantera tenella*, *Datura stramonium* and *N.tabacum* (cv. Turkish NN) did not show symptoms and were ELISA negative when inoculated in both seasons. In a general way, the susceptible plants showed the same reaction to PVS in both seasons, excluding *C. amaranticolor*, which did not presented symptoms when inoculated in December with ATL and CAL.R isolates. Tomato plants (*Lycopersicum esculentum*) cv. Santa Clara reacted with leaf interveinal purple symptoms and showed purple rings on the lower face of leaf when inoculated with CAL.R, CHIP and IDA.R. isolates. These particular symptoms were not yet described for PVS infected tomato plants. The potato plants infected with PVY, which were grafted with potato haulms infected with PVS, showed an increment of symptom severity, in all the tested cultivars: Atlantic, Ágata and Monalisa. It was characterized by an intense mosaic, wrinkling and reduction of leaf area. The secondary symptoms exhibited by potato plants, originated from tubers infected with PVS + PVY, were also more intense when compared with plants infected only with PVY or PVS. A clear interaction between these two viruses, which induced higher disease severity in mixed infections was showed. Besides the higher severity, the Monalisa cultivar also displayed a severe leaf distortion in mixed infection. The nucleotides alignment of the CP region of IDA.R PVS isolate, with eighteen PVS isolates from gene bank, showed an identity variable between 80 (with both: AF493951 isolate from England and D00461 isolate

isolate from England and D00461 isolate from Canada) and 95% (with the AY079209 isolate from China). The smallest amino acids identity was 93% with AF493951 isolate and 94% with D00461 isolate, and the highest identity was 100% with AF493950 isolate from England. The phylogenetic tree based on amino acid sequence showed that IDA.R. was grouped with the AY079209 isolate, separated from AF493951 e D00461 isolates, that belong to the PVS<sup>A</sup> strain: It indicates that IDA.R. PVS isolate is a PVS<sup>O</sup> strain. The same grouping pattern was observed in the nucleotide tree.

---

<sup>1</sup>Major professor: Antonia dos Reis Figueira – UFLA

## **CAPÍTULO 1**

### **Aspectos biológicos e moleculares do vírus S (*Potato virus S* - PVS) da batata**

## 1 INTRODUÇÃO GERAL

^ [A batata (*Solanum tuberosum* L.) é uma hortaliça de grande expressão na agricultura, ocupando o segundo lugar em valor nutritivo, proteínas, calorias, aminoácidos, sais minerais e vitaminas (Vechi & Hirano, 1984).] É largamente cultivada no território nacional, em diversas latitudes, até três vezes por ano. A área plantada no ano de 2004 foi de quase 136 mil hectares, com produção de 2,84 milhões de toneladas (AGRIANUAL, 2005).

^ [Diversos fatores podem afetar a produção da batata, destacando-se, entre eles, a infecção por patógenos diversos.] O fato dessa planta ser propagada vegetativamente facilita a transmissão desses patógenos por meio das sementes, provocando a sua degeneração após poucas multiplicações em campo (Costa, 1948; Cupertino & Costa, 1970; Hooker, 1981; Bokx, 1987; Souza Dias & Costa, 1984; Figueira et al., 1985). [O acúmulo de vírus tem sido apontado como o principal fator responsável pela degenerescência da batata-semente, resultando na redução do número e no tamanho dos tubérculos, o que afeta significativamente a sua produtividade (Santos Costa, 1965; Bokx, 1987).]

[Atualmente, já foram detectados mais de 40 vírus infectando a batata no mundo (Beemster & De Bokx, 1987).] Felizmente, apesar de muitos deles já terem sido detectados nas regiões produtoras brasileiras, a maioria não representa risco potencial para o Brasil (Souza Dias et al. 1995).

Antes de 1995, o vírus do enrolamento da folha (*Potato leafroll virus-PLRV*) era considerado o único causador de perdas na bataticultura brasileira (Costa, 1948; Cupertino & Costa, 1970; Souza Dias et al., 1984; Souza Dias et al. 1990). A partir daí, com a introdução de uma estirpe mais agressiva do vírus Y da batata (*Potato vírus Y-PVY*) em batata-semente cultivar Achat, importada da Europa, esse vírus passou a ser considerado também importante (Figueira et al.,

1996a;b). Sua rápida disseminação no campo ocasionou perdas nos lotes de batata-semente, primeiramente detectadas no estado de Minas Gerais e depois em todos os outros estados produtores do país, alterando a epidemiologia dos vírus que afetam a cultura da batata no país. (Figueira et al., 1996a;b; Moraes et al., 1997). Nessa mesma época, outras estirpes de PVY entraram no país por meio de sementes importadas do Canadá (Souza Dias et al., 1995), de modo que, atualmente, o vírus Y da batata é uma das principais causas da degenerescência da batata no Brasil.

Esse fato alertou também as entidades de fiscalização fitossanitária para a possibilidade da importação de viroses consideradas de pouca importância no presente, por estarem ausentes no campo, mas que poderão se tornar importantes, caso estirpes mais adaptadas sejam introduzidas. O vírus S da batata (*Potato virus S* - PVS) e o vírus X da batata (*Potato virus X* - PVX) são exemplos de vírus considerados de pouca importância, não estando, até o presente momento, associados a perdas significativas na cultura da batata no Brasil. Entretanto, sabe-se que, quando sozinhos na planta, as perdas provocadas por eles podem chegar a 10 ou 20% (Wetter, 1971; Bemster & De Bokx, 1987; De Bokx, 1987); mas, quando associados a outros vírus, podem causar um efeito sinérgico e induzir perdas bem maiores (Wright, 1970; Mizubuti, 1981; De Bokx, 1987; Marton et al., 1993; German, 2001).

O PVS é um dos vírus mais comuns na cultura da batata (Slack, 2001). No Brasil, sua existência já foi constatada em todos os estados produtores (Cupertino et al., 1970; Figueira et al., 1985; Daniels, 1995; Figueira, 1995; Hirano, 1995, Souza Dias, 1995), mas não tem representado grande problema para a cultura, provavelmente porque ele ou está ausente ou ocorre em níveis muito baixos nas sementes que são utilizadas para multiplicação (Figueira, 2002). Entretanto, com a abertura da importação de batata-semente de outros países, onde a incidência desses vírus tem sido historicamente alta, é importante



tomar medidas para preservar a cultura da batata no Brasil (Figueira, 2002). Em 2001, Souza Dias et al. detectaram índices de 80% de PVS em sementes básicas importadas na cultivar Atlantic. Esses índices atípicos em sementes importadas foram também constatados entre os anos de 2002 a 2004 no Centro de Indexação de Vírus de MG, onde se detectaram índices de até 90% em batata-semente importada para pesquisa (Figueira et al., 2004).

Como o PVS não tem representado problemas no Brasil, pouco se sabe sobre as propriedades biológicas e moleculares dos isolados que aqui ocorrem, bem como do seu comportamento no campo. O objetivo deste trabalho foi estudar alguns dos isolados introduzidos no Brasil por meio de tubérculos-semente contaminados, visando determinar as suas características biológicas e moleculares, bem como a sua possível interação com o PVY.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Batata: importância da cultura e principais doenças

[A batata (*Solanum tuberosum* L.) é originária da região Andina da América do Sul, onde era consumida por populações nativas. Foi introduzida na Europa por volta de 1570, provavelmente por colonizadores espanhóis, tornando-se importante alimento, principalmente na Inglaterra. Posteriormente, passaria a ser cultivada na Holanda, na Suécia, na Alemanha e na América do Norte, não só para a alimentação como também para a produção de batata-semente, cujo comércio expandiu-se acentuadamente após a Segunda Guerra Mundial (Mallozzi, 1982). Após a sua domesticação o cultivo da batata estendeu-se para vários países fora do seu centro de origem.]

[Os principais estados brasileiros produtores são Paraná, São Paulo e Minas Gerais.] Este último há sete anos ocupa a primeira posição em produção (AGRIANUAL, 2005). [A perda de produtividade acarretada pelo plantio de sementes com altos índices de infecção virótica, que podem levar à degenerescência completa das sementes em poucas gerações, é um dos principais problemas enfrentados pela bataticultura nacional, desde que se iniciou o cultivo da batata no Brasil (Costa, 1965; Cupertino et al., 1970; Mallozzi, 1984). Isso porque, aqui, a disseminação de vírus é mais intensa do que em países temperados, devido aos cultivos sucessivos e à existência de vetores no campo durante todo o ano.] Portanto, o principal problema decorrente de material importado está, na maioria das vezes, associado ao aspecto fitossanitário.

Quase 80% da semente de alta sanidade utilizada na cultura da batata são importados de países europeus como Holanda, Bélgica, Alemanha e de países da

América do Norte como Canadá e Estados Unidos. Isso representa um custo de 55 dólares/30 kg, perfazendo cerca de 35 a 40% do custo de produção por hectare (Seednews, 2005). O comércio de sementes de batata é distinto do de batata para consumo, é movimentou cerca de 2,0 milhões de dólares com média de 3,2 toneladas comercializadas no período de 1999 a 2003 (AGRIANUAL, 2005).

[A necessidade da importação de batata-semente, além de onerar os custos de produção, representa ainda um perigo eminente à entrada de patógenos no país. Para minimizar o problema, os órgãos brasileiros de fiscalização fitossanitária estabeleceram regras para a importação e comercialização de sementes.] Existem pragas que são consideradas quarentenárias A1, como é o caso do viróide *Potato Spindle Tuber Viroid* (PSTVd), que ainda não existe no Brasil, sendo portanto proibida a sua presença nas sementes, devido ao seu potencial de dano para a cultura. Outras são as pragas já existentes no país, denominadas pragas não quarentenárias regulamentadas, cujo índice de incidência nas sementes é controlado, visando evitar perdas de produção (Brasil, 2001).

De acordo com a Instrução Normativa N° 5, de 8 de março de 2004, os seguintes patógenos estão na lista de pragas não quarentenárias regulamentadas, sujeitos a diferentes limites de tolerâncias para cada classe comercial: fungos (*Rhizoctonia solani*, *Helminthosporium solani*, *Spongospora subterranea*, *Fusarium* spp, *Phytophthora infestans*, *Alternaria* spp, *Cylindrocladium* spp), bactérias (*Streptomyces* spp. , *Ralstonia solanacearum*, *Erwinia* spp) nematóide (*Pratylenchus* spp) e vírus (*Potato virus leafroll* - PLRV, *Potato virus Y*-PVY, *Potato virus X*-PVX).

O PVS já esteve classificado como praga não quarentenária regulamentada, com índices bastante restritivos (0,0% para classe básica, 1,0% para classe registrada e 1,5% para classe certificada, de acordo com a Instrução

Normativa nº 18 de 5 de setembro de 2001). Por um engano de interpretação, o PVS foi retirado desse documento, porém, movimentos realizados pela comunidade científica brasileira desfizeram esse engano, e o PVS deverá ser novamente incluído na próxima instrução normativa com os mesmos índices estabelecidos para o PVX.

Apesar da legislação estabelecer limites de tolerância para os vírus não quarentenário regulamentados, tem sido constatada a entrada no país de sementes com incidências maiores que as permitidas e mesmo com novos patógenos (Souza Dias et al., 2001, Figueira et al., 2004). Com o crescente trânsito internacional, o programa de certificação é de fundamental importância para o cumprimento dos padrões estabelecidos para cada classe de semente, contribuindo para a comercialização de material de boa qualidade.

A indexação é a principal ferramenta, sobretudo para os vírus que não induzem sintomas, como o PVX e o PVS, para impedir a sua introdução em lugares onde ainda não estão presentes (Goth & Webb, 1985).

As ferramentas de diagnose, tais como técnicas de hibridização de ácidos nucléicos, técnicas de microscopia molecular e, principalmente, o teste sorológico ELISA (Enzyme Linked Imunosorbent Assay), têm revolucionado a qualidade de detecção de viroses em larga escala (Slack & Singh, 1998).

Em Minas Gerais, desde 1986 o programa de certificação vem sendo essencial para o controle de viroses no campo, garantindo a qualidade da bataticultura mineira e colocando o estado em posição de destaque no cenário nacional.

## **2.2 *Potato virus S* (PVS): características gerais da partícula**

Até muito recentemente, o PVS não se encontrava classificado em nenhuma das famílias de fitovírus já criadas, constando no sistema de

classificação apenas como uma espécie pertencente ao gênero *Carlavirus*. Em 2004, o *International Committee on Taxonomy of Viruses* (ICTV) aprovou a proposta para criação de uma nova família, denominada de *Flexiviridae*, na qual foram colocados o gênero *Carlavirus* e mais sete outros gêneros: *Allexvirus*, *Capillovirus*, *Foveavirus*, *Potexvirus*, *Trichovirus*, *Vitivirus* e *Mandarivirus* (Adams et al., 2004). Todos esses vírus possuem partículas flexuosas com 12-13 nm de diâmetro, genoma único com ssRNA positivo e cauda poli A. Possuem RNA subgenômico para a tradução de algumas ORFs (*Open Read Frames*) e até seis ORFs com a seguinte ordem na direção 5'-3': uma proteína de replicação ("alpha-like") contendo domínios conservados de metil-transferase, helicase e RNA polimerase dependente do RNA (RdRp), com 150-250 kDa; uma ou mais proteínas de movimento (MP); uma única proteína do capsídeo (CP) com 22 a 44 kDa e uma sexta ORF, presente em alguns vírus, que pode sobrepor parcialmente o terminal 3' do gene da CP e parece ter propriedades de ligação com nucleotídeos.

O gênero *Carlavirus* tem como membro tipo o *Carnation latent virus* (CLV) e tem sido um dos maiores e menos estudados dos gêneros de vírus de plantas. Algumas de suas espécies são conhecidas por induzirem pouco ou nenhum sintoma, sendo por isso geralmente chamados de vírus que provocam sintomas latentes. Muitos *Carlavirus* causam sintomas leves em algumas hospedeiras, somente nos estágios iniciais de infecção. Por isso, o gênero *Carlavirus* ficou esquecido durante muitos anos e, na maioria dos casos, foi descoberto somente quando formava um complexo de infecção com outros vírus. Devido a essa inexistência de doenças severas causadas pelos *Carlavirus*, eles não receberam atenção por parte dos fitopatologistas (Foster, 1992).

A partícula do PVS possui simetria helicoidal, com 12 nm de diâmetro por 650 nm de comprimento e um genoma constituído por 7,5 kb. Utiliza dois RNAs subgenômicos para a replicação, sendo um de 2,5 e outro de 1,3 kb que

está relacionado com a tradução da proteína do capsídeo. Possui uma cauda poli-A na extremidade 3' dos RNAs genômico e subgenômicos e uma estrutura do tipo "cap" na extremidade 5' do RNA genômico (Foster & Mills, 1990; Foster & Mills, 1991; Foster, 1992). O RNA genômico possui seis ORFs (Figura 1). Considerando-se o sentido 5'-3', 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 parece estar relacionada com a 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' (Regenmortel et al. 2000, Foster, 1992).

Como ocorre com outros fitovírus, a proteína da capa tem sido objeto de estudo para a identificação de estirpes (Foster & Mills, 1991) e para a procura de genes de resistência ao vírus S (MacKenzi & Tremaine, 1990).

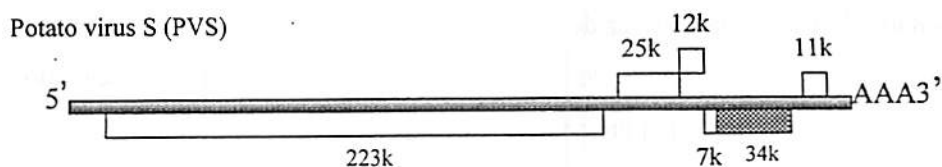


FIGURA 1. Esquema do genoma do PVS

O PVS possui ponto de inativação térmica entre 55°C e 60 °C , ponto final de diluição entre  $10^{-2}$  e  $10^{-3}$  e sua longevidade in vitro, a 20°C, é de 3 a 4

dias (Regenmortel et al, 2000). É altamente antigênico e por isso, a sorologia é geralmente usada em sua diagnose, apresenta relacionamento sorológico distante com outros *Carlavirus* como *Potato virus M*(PVM) e *Carnation latent virus* (CLV).

### **2.3 Transmissão e disseminação do PVS**

O PVS pode ser transmitido principalmente por enxertia, inoculação mecânica e por contato entre plantas. A transmissão via batata-semente contaminada e por contato parece ser, na maioria das vezes, a forma mais efetiva para a transmissão desse vírus. Dessa forma após a introdução do PVS no campo por meio de sementes contaminadas, sua disseminação ocorre facilmente por meio do contato natural entre plantas vizinhas, por implementos agrícolas, roupas, nas operações mecânicas durante o transporte, classificação e também no armazenamento durante a fase de desenvolvimento dos brotos (Slack, 1983; Beemster & De Bokx, 1987).

Trabalhos realizados com a finalidade de investigar a velocidade da disseminação mecânica do PVS, no campo, têm indicado que essa depende do isolado de PVS e da cultivar de batata. De Bokx (1972) estudou a disseminação de oito diferentes isolados do PVS em condições de campo, empregando as cultivares Eersteling e Alpha, com 10% de infecção. No final do ciclo, a cultivar Eersteling apresentou de 56% a 76% de infecção, enquanto que a cultivar Alpha mostrou índices de 2% a 28%, com um padrão de distribuição das plantas infectadas no campo, bastante típico de disseminação mecânica pelo contato entre as plantas. Esse autor encontrou evidências de que a velocidade de disseminação variou com o isolado viral e a cultivar empregada no estudo.

Khalil & Shalla (1982), estudando a disseminação do PVS por meio de afideos e do contato manual em casa de vegetação e campo, concluíram que o

isolado estudado foi transmitido somente por contato entre as plantas. As novas plantas infectadas apareciam sempre ao lado da fonte de vírus, o que comprovou ter ocorrido somente disseminação mecânica. Em condições de campo, o número de plantas dobrou em apenas uma estação de plantio.

Franc & Banttari (1984), na tentativa de explicar a transmissão do PVS nas cultivares Russet Burbank, Norland e Kennebec, avaliaram plantas de batata oriundas de tubérculos cortados nos brotos e tubérculos cortados sem o contato com os brotos, com lâminas contaminadas com PVS, colocados em diferentes superfícies. As cultivares Kennebec e Russet Burbank apresentaram contaminação maior do que a cultivar Norland. A contaminação dos tubérculos que foram cortados sobre os brotos foi maior, em todas as cultivares, do que a dos tubérculos cortados, evitando-se o contato com os brotos. As superfícies que mais mantiveram a infectividade do PVS foram aquelas que apresentaram umidade relativa de 100% a 4°C. Superfícies de madeira, não pintadas, mantiveram o inóculo infectivo por mais tempo.

Esses mesmos autores (Franc & Banttari, 1996) estudaram a translocação e a disseminação do PVS nas cultivares Norland, Russet Burbank e Kennebec, distribuindo plantas de batata infectadas com incidência inicial de 3,33% para servir como fonte de inóculo. No final de duas multiplicações as incidências foram de 71,8%, 73% e 29,5%, respectivamente. A translocação das partículas virais para os tubérculos ocorreu dentro de 24 horas, mas só pode ser detectada em 13 dias para as cultivares Norland e Russet Burbank e em 20 dias para a cultivar Kennebec, mostrando a diferença de reação, à infecção pelo PVS, entre as cultivares.

Segundo Morelli & Vayda (1996), a tradição de corte dos tubérculos para plantio em alguns países pode aumentar muito a dispersão do PVS, uma vez que seus estudos comprovaram que a replicação do vírus é induzida por ferimentos produzidos nos tubérculos. Esse fato pode explicar porque sementes



mais antigas são aquelas que mais estão infectadas com vírus S (Cupertino et al, 1970) e também porque as cultivares que apresentaram maiores índices de PVS no Sudão foram as cultivares regionais que estavam sendo multiplicadas continuamente (Omer & El-Hassan, 1994).

Apesar de a maioria dos isolados de PVS originalmente estudados não possuírem vetor na natureza, alguns autores descobriram isolados, pertencentes ao grupo de estirpes Andinas capazes de ser transmitidos pelo vetor *Myzus persicae* (Jones et al., 1981 citado por Čerovská & Filigarová, 1995; Slack, 1981; 1983). Então, para discriminar as estirpes de PVS transmissíveis por vetor, das não transmissíveis, normalmente mais comuns, as estirpes andinas passaram a ser chamadas de PVS<sup>A</sup>, enquanto que as não transmissíveis ou comuns passaram a ser designadas como PVS<sup>o</sup> (Jones et al., 1981 citado por Čerovská & Filigarová, 1995 ; Slack, 1983).

Após divulgada a existência da estirpe PVS<sup>A</sup>, transmissível por vetor, muitos outros trabalhos, estudando a sua transmissibilidade ou levantando a possibilidade de transmissão de isolados do PVS, foram conduzidos. Weidemann (1986) estudou a dispersão do PVS durante três anos. No final do primeiro ano houve um incremento de 64% e, no final dos três anos, 79,1% das plantas estavam infectadas. Os experimentos em condições de laboratório mostraram taxas de transmissão por afídeos de apenas 2,9%. Além do espaçamento entre plantas ter sido suficiente para que as plantas se tocassem, favoreceu para que afídeos passassem de uma planta para outra, incrementando mais rapidamente a dispersão da doença.

Pode-se observar que a taxa de transmissão do PVS<sup>A</sup> pelo vetor parece ser geralmente baixa. Wardrop et al. (1989) utilizaram as espécies *Myzus persicae*, *Aphis nasturtii*, *Macrosiphum euphorbiae*, *Aulocarthum solani* e *Rhopalosiphum padi* para testar a transmissão do PVS de batata para batata e de batata para *Nicotiana debneyi*. Duas dessas espécies, *Myzus persicae* e *Aphis*

*nasturtii*, foram capazes de transmitir o PVS para plantas de batata, a uma taxa de 5,9% a 14,3%, mas a transmissão para plantas de *Nicotiana debneyi* não foi observada.

Weidemann & Koenig (1990) compararam dois isolados de PVS<sup>A</sup>, sendo um isolado oriundo da região andina e outro da Alemanha, por meio de testes de transmissão por afídeos, inoculação mecânica em *Chenopodium quinoa*, testes de hibridização e sorologia. A distinção entre os dois isolados só foi possível pelo teste de hibridização com cDNA e pelas taxas de transmissão pelo afídeo *Myzus persicae*, que foram de 8,5% para o isolado oriundo da região andina e 2,4% para o isolado da Alemanha, mostrando que as estirpes do grupo PVS<sup>A</sup> não são uniformes.

Por ser transmitida por vetores, representando assim um risco adicional para a produção de batata-semente, a estirpe PVS<sup>A</sup> foi incluída na lista de patógenos quarentenários da Europa (Čeřovská & Filigarová, 1995). Entretanto, a detecção desta estirpe é uma tarefa nada fácil, exigindo técnicas mais sensíveis, como as moleculares, uma vez que a utilização do vetor, além de demorada, é pouco eficiente devido à sua baixa porcentagem de transmissão.

As perdas de produção pelo PVS dependem dos isolados e das cultivares e nem sempre são muito altas, em relação às outras viroses, com média de 10% a 20% de perdas (Wetter, 1971; Bemmster & De Bokx, 1987), se estiver sozinho na planta, podendo ser maior quando associado a outros vírus em infecções mistas. Existem relatos de infecções mistas com os vírus PVA, PVY, PVX e PVM (Weidemann, 1986; German, 2001; Wright, 1970; Marton et al., 1993; Manzer et al. 1978; Stace-Smith & Mellor, 1968; Hahm, 1981; Theoduloz et al. 1992; De Estrada, 1993; Boonham et al., 2003; Talens, 1979), causando mosaico severo e altas perdas no campo (Slack, 2001).

Wright (1970) observou que a simples erradicação do PVS e do PVX, nas cultivares *Netted Gem* (Russet Burbank) e *White Rose*, aumentou o

rendimento da produção em 11% a 38%, com as plantas livres de PVS produzindo um número de tubérculos de 10% a 32% maior. Manzer et al. (1978) estudaram os efeitos de plantas somente com PVS, plantas com PVS e PVX de isolados ditos 'fracos'(sem sintomas) e PVS e PVX ditos 'moderados'(apresentando mosaico), nas cultivares Russet Burbank, Kennebec e Katahdin. Eles observaram em todas as cultivares diminuição do peso e tamanho dos tubérculos. Cultivares somente com PVS apresentaram diminuição de 3% na produção. Com exceção da cultivar Kennebec todas as outras apresentaram diminuição de produção em 2% para PVS e PVX 'fracos' e de 8% para PVX e PVS 'moderados'. O estudo ainda indicou que a taxa de reinfeção foi de 67% apesar de terem sido feitos esforços para minimizar o contato mecânico mostrando maior dificuldade para se manter os estoques sem PVS do que sem PVX.

Marton et al. (1993), avaliando a degenerescência causada por viroses observaram decréscimos na produção de 49%, quando 100% dos tubérculos infectados somente com PVS, e de 77,55% quando o PVS estava associado ao PLRV. Segundo German (2001), podem ocorrer perdas da ordem de 40% quando o PVS se associa ao PVM ou PVX.

O principal problema da infecção da planta de batata pelo PVS é que, uma vez presente, esse é bastante difícil de ser erradicado. Outros trabalhos também já mostraram a dificuldade de manter os estoques livres do PVS. As tentativas para a eliminação de infecções mistas dos vírus X e S feitas por Stace-Smith & Mellor, em 1968, revelaram que a eliminação de PVX foi mais efetiva que a eliminação do PVS. McDonald (1987), comparando níveis de infecções de PVS e PVY no campo em tubérculos e plantas originadas de culturas de meristemas, observou índices maiores de infecção em plântulas do que em tubérculos e também níveis muito maiores de infecção com PVS do que com

PVX. Os autores não descartaram a possibilidade de ter ocorrido transmissão por afídeos.

Halm et al. (1981), estudando reinfecções de PVS e PVX em diversas cultivares, observaram grandes diferenças entre cultivares, isolados e fase de desenvolvimento da cultura. Em geral, a recontaminação apareceu mais rapidamente com o PVS do que com PVX, sendo o PVS mais difícil de ser eliminado.

A expansão da disseminação do PVS em estoques de sementes é favorecida pela ausência de sintomas visíveis na planta, dificultando a sua eliminação no campo. Portanto, muitos programas têm sido criados, em diferentes países produtores, com o objetivo de eliminar o PVS dos seus estoques de sementes. Isso aconteceu na Holanda em 1955, no Canadá em 1969, na Nova Zelândia na década de 1980 (Fletcher, 1996), na República Theca em 2004 (Dedic et al., 2004) e em algumas regiões nos Estados Unidos, porém, estes programas nem sempre conseguem a eficiência desejada. Altas incidências de PVS têm sido encontradas em sementes produzidas por países tradicionais na exportação de sementes de batata (Dolby & Jones, 1987; Souza Dias & Silva, 2001; Figueira et al., 2004).

#### **2.4 Aspectos biológicos e moleculares**

O PVS é capaz de infectar poucas espécies de hospedeiras, principalmente das famílias *Solanaceae*, *Chenopodiaceae* (Wetter, 1971) e *Amaranthaceae* (Wetter, 1971, Bemster & de Bokx, 1987). Os sintomas provocados por esse vírus geralmente são latentes, de modo que é muito difícil fazer a sua diagnose visual em condições de campo. Algumas cultivares são mais suscetíveis e mostram aprofundamento das nervuras na parte superior da folha, que pode se tornar rugosa. Outras reagem com mosqueado leve e, às

PVS e observaram que foram altamente resistentes à infecção por esse vírus. Mackenzie et al.(1991) obteve resultados semelhantes quando utilizou o mesmo gene, para transformar plantas de batata da cultivar Russet Burbank, e observou que essas plantas apresentaram também uma certa resistência ao PVM.

## 2.5 Ocorrência

O PVS foi descoberto na Holanda em 1951 (de Bruyn Ouboter, 1952) e desde então tem sido encontrado em todos os lugares onde se planta batata no mundo (Wetter, 1971; Foster, 1991; Foster, 1992). Para alguns países a presença do PVS constitui um problema real. Talens (1979), avaliando a incidência do vírus X, Y e S em diversas províncias nas Filipinas, encontrou campos com 10,8% de PVS, 44,6 % de PVX e PVS, 2,7% de PVS e PVY e 9,5% de PVX, PVS e PVY. Esse autor ressaltou que a presença do PVS (incidência total de 69%) e PVX (com incidência total de 74%), sozinhos ou em infecções mistas, constituíam-se nos maiores obstáculos para o aumento da produtividade naquele país.

Omer & El- Hassan (1994), avaliando as doenças causadas por vírus em cultivares locais e certificadas, encontrou níveis de infecção de 89% para o PVS na cultivar local denominada Zalinge e de 3,9% em batatas certificadas da cultivar Alpha. Segundo o autor, esse alto nível de infecção explicaria a produção de tubérculos pequenos e a diminuição da produtividade nas regiões do Sudão onde o trabalho foi realizado.

No Brasil, o *Potato virus S* já é conhecido há bastante tempo, tendo sido detectado em batata-semente importada e campos de produção, porém, quase sempre em índices negligíveis. Cupertino et al.(1970) constatou a presença do PVS em batata-semente importada nas cultivares Áquila, Carla, Clívia, Condea, Datura, Delos, Delta A, Gueisha, Gunda, Ransa, Hela, Irmgard, Mensa,

Oberarnbach Frühe, Oda, Pamir, Reinhort, Sommerstoke, Tasso, Valuta, Vanda e Wilja e nas cultivares nacionais: Aracy, Araruama, Baronesa, Madrugada, Piraquara, Piratini e Yara. Daniels & Castro (1984) e Daniels (1995) detectaram, no Rio Grande do Sul, campos que chegaram a 100% de plantas infectadas. Esse, porém, é um fato isolado e provavelmente ocorreu em campos onde foram utilizadas sementes próprias, em multiplicações sucessivas, sem controle de incidência de vírus. Como o PVS não provoca sintomas severos, a sua detecção visual é muito difícil e as perdas por ele causadas podem passar despercebidas. Quando Figueira et al. (1985) investigaram a incidência de vírus em plantas oriundas de campos de produção de batata semente e para consumo, localizados no sul de Minas Gerais, detectaram índices máximos de 0,7% de PVS.

Com a recente importação de batata-semente de outros países, onde o PVS ocorre em incidências maiores, alguns lotes de sementes importadas têm apresentado altos índices de PVS. Souza Dias & Silva (2001) encontraram lotes de batata-semente importada, cultivar Atlantic, com 80% de incidência de PVS. Da mesma forma, Figueira et al. (2004) detectaram índices médios de 25,5% de PVS em sementes oriundas de países como Canadá, Estados Unidos e França, todos destinados a pesquisas, com um deles mostrando 90% de incidência. Outros lotes de sementes produzidas fora do sistema de certificação, provavelmente com sementes de origem duvidosa, apresentaram índices de 60% a 80 % de PVS, mostrando que a preocupação com o controle do PVS é legítima e deve ser incentivada.

### 3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, M.J. et al. The new plant virus family *Flexiviridae* and assessment of molecular criteria for species demarcation. *Archive of Virology*, n.149, p.1045-1060, 2004.

AGRIANUAL. **Anuário da Agricultura Brasileira**. São Paulo: FNP: Consultoria e Comércio, 2005.

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

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

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.

BRASIL. Ministério da Agricultura. Instrução Normativa n. 26 de jun.de 2001. Regulamenta pragas não quarentenárias regulamentadas. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, n.126, 02 jun. 2001. Nota 4.

ČEŘOVSKÁ, N.; FILIGAROVÁ, M. Specific detection of the Andean strain of potato virus S by monoclonal antibodies. *Annual Applied Biology*, v.127, p.87-93, 1995.

COSTA, A.S. **Doenças de vírus do fumo, batata e tomateiro**. Rio de Janeiro, 1948. 82p. (Boletim do Ministério da Agricultura)

COSTA, A.S. **Moléstias de vírus da batata**. Campinas: Instituto Agronômico de Campinas, 1965. p.68-83. (Boletim de Campo).

↙ 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.; CASTRO. L.A. Incidência de viroses em lavouras de batata no Rio Grande do Sul. **Fitopatologia Brasileira**, v.9, p.398, 1984.

↙ 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.

DE BOKX, J.A. Spread of potato virus S, **Potato Research**, v.15, p.67-70, 1972.

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

DEDIC, P. et al. *Potato virus S* (PVS) and its elimination from potato maintenance breeding in Czech Republic. In: EAPR VIROLOGY SECTION MEETING, 12, 2004, Rennes, France. **Abstracts...** Rennes, France: INRA. Poster 59, p.94:

DE ESTRADA, Y. R. Incidencia de los virus PVX, PVS, PVY y PLRV pérdida de rendimientos en semillas de papa nacional e importada en Venezuela. **Rev. Fac. Agron**, Maracay, v.19, p.102-103, 1993.

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. et al. Ocorrência dos vírus que infectam a batateira na região Sul de Minas Gerais. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.10, n.2, p307, 1985. Resumo.

↙ 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.; MORAES, F.H.R.; PINTO, A.C.S. New PVY necrotic strain is causing great losses in Brazil. **Phytopathology**, Saint Paul, v.86, n.11, p.85, Nov. 1996a. Supplement.



- FIGUEIRA, A.R.; PINTO, A.C.S; MORAES, F.H.R. Alta incidência da nova estirpe necrótica do vírus Y da batata está ocorrendo em todos os estados produtores do Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.21, p.432, ago.1996b. Suplemento.
- 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. Suplemento.
- FLETCHER, J.D.; *Potato virus S<sup>A</sup>* – 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. 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. 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.; 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. The structure and expression of the genome of *Carlavirus*. Mini-review. **Research in Virology**, Paris, n. 143, p.103-112, Feb.1992.
- FOSTER GD, MILLS PR. 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. 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.

GOTH, R.W.; WEBB, R.E. Detection and distribution of latent viruses in the potato cultivar Atlantic. **Plant Disease**, n.20, p.851-853, Oct. 1985.

HALM, Y.; SLACK, S.A.; SLATTERY, R.J. Reinfection of potato seed stocks with potato virus s and potato virus x in Wisconsin. **American Potato Journal**. v.58, p.117.125, 1981.

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.

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

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

MacKENZIE, D.J.; TREMAINE, J.H. Transgenic *Nicotiana debneyii* expressing viral coat protein are resistant to *Potato virus S* infection. **Journal and General Virology**, v.71, pt.9, p.2167-2170, Sept. 1990.

MacKENZIE, D.J.; TREMAINE, J.H, MCPHETERSON-J. Genetically engineered to *Potato virus S* in potato cultivar Russet Burbank. **Molecular Plant Microbe Interactions**, v.4, n.1, p.95-102, 1991

MALLOZZI, P.R. Certificação da batata-semente em relação às viroses. In: CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE FITOPATOLOGIA, 15, COLÓQUIO DE VIROLOGIA VEGETAL, 4., 1982, São Paulo. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.7, p. 453-455, out. 1982.

- MALOZZI, P. Importância da avaliação da sanidade da batata-semente e teste de pré-cultura. In: SEMINÁRIO "ÁLVARO SANTOS COSTA" SOBRE VIROSES DE BATATA, 1984, Campinas. **Horticultura Brasileira**, v.2, n.2, p.65-66. 1984.
- MANZER, F.E.; MERRIAM, D.C.; HELPER, P.R. Effects of potato vírus S and two strains of potato vírus X on yields of russet Burbank, Kennebec, and Katahdin cultivars in Maine. **American Potato Journal**, v.55, p.601-609, 1978.
- MÁRTON, L. et al. Degenerescência devido a viroses em cultivares de batata. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.11, p.82, 1993. Resumos.
- MATOUSEK, J.; et al. 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
- MCDONALD, J.G. Comparative levels of potato viruses S and Y infection of microplants and tuber-propagated plants in the field. **American Potato Journal**, v.64, p.517-521, 1987.
- MIZUBUTI, A.; Principais viroses da batateira sob condições de Brasil Central. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v.7, n.76, p.46-50, abr.1981.
- MORAES, F.H.R.; FIGUEIRA, A.R.; SANTOS, R.C. Caracterização da nova estirpe do vírus Y da batata. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.22, p.339, 1997. Suplemento.
- 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.
- OMER, A.D.; EL-HASSAN, S.M. Location and cultivar variations in the prevalence of potato virus disease in the Sudan. **Tropical Agriculture** Trinidad, v. 71, n.3., p. 200-203, July, 1994.
- REGENMORTEL, M. et al. **Virus Taxonomy: Genus *Carlavirus***. San Diego: Academic, 2000. Seventh Report of International Committee on Taxonomy of Virus. p.475-478,
- ROSE, D.G. Some properties of an unusual isolate of potato virus S. **Potato Research**, v.26, p.49-62, 1983.

SANTOS COSTA, A. Moléstias de vírus da batata. **Boletim de campo**, Rio de Janeiro, n. 190, p. 68-83, jun./jul. 1965.

SEEDNEWS. A Revista Internacional de Sementes. Jan.2005.Disponível em: <[www.seednews.inf.br/portugues/seed82/artigocapa82a.shtml](http://www.seednews.inf.br/portugues/seed82/artigocapa82a.shtml)>. Acesso em: 13 maio 2005.

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

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.

SLACK, S.A.; SINGH, R.P.; Control of viruses affecting potatoes through seed potato certification programs. In: HADIDI, A.; KHETARPAL R.K.; KOGANEZAWA, H. (Ed.). **Plant virus disease control**, Minnesota, 1998. p.249-260, 1998.

SLACK, S.A. *Potato virus X*. In: STEVENSON, W.R.et al. (Ed.).**Compendium of Potato Diseases**. 2.ed. St Paul, 2001.p.69.

SOUZA DIAS, J. A.C; AMANCIO, AV., COSTA, A.S.O vírus do enrolamento da folha da batata continua a ser a principal causa da degenerescência da batata semente no estado de São Paulo. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.15, n.2, p.136, jul. 1990.

SOUZA DIAS, J. A.C; COSTA, A.S. Método “cova/pré-plantio”na seleção da batata-semente.[S.l.] Fundação Cargill. 1984.68p.

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.; TRISTÃO, J.F.;MIRANDA, H.S.Vírus Y da batata-semente cv Atlantic : alteração na epidemiologia da virose de São Paulo e Paraná. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.20, p.320, ago. 1995. Suplemento.

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. Resumo.

STACE-SMITH, R; MELLOR, F.C. Eradication of potato viruses X and S by thermotherapy and axillary bud culture. *Phytopathology*, v.58, p.199-203, Feb. 1968.

TALENS, T.T. Potato viruses in the Philippines: Detection and identification of potato viruses X, S, and Y. April-June, *Philippine Agriculturist*, v. 62, p.144-148, 1979.

THEODULOZ, C. et al. The incidence of potato virus X, Y, and S in the Chilota potato collection. *American Potato Journal*, v.69, p 827-830, 1992.

VECHI, C.; HIRANO, E.; Situação da batata-semente no Brasil. Seminário "Álvaro Santos Costa" sobre viroses de batata. *Horticultura Brasileira*. v.2, n.2, p.55-58, 1984.

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

WETTER, C. **Description of plant viruses: *Potato virus S***. Surrey, England: Commonw. Mycol. Inst. /Assoc.Appl.Biol.,Kew. 1971. n.60.

WEIDEMANN, H.L. The spread of potato viruses S and M under field conditions. *Potato Research*, v.29, p.116, 1986. Summary.

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. Resumo CAB

WRIGHT, N.S. Combined effects of 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**

**Sintomas provocados pelo *Potato virus S* (PVS) em hospedeiras e sua interação com o *Potato virus Y* (PVY) em plantas de batata**

### 3 INTRODUÇÃO

A batata é o quarto alimento em importância no mundo, superada apenas pelo trigo, milho e arroz. Atualmente os maiores países produtores são: China, Rússia, Índia, Estados Unidos, Ucrânia e Polônia. O Brasil ocupa o 19º lugar com produção de 3.1 mil toneladas métricas no ano de 2003 em uma área de aproximadamente 150 mil hectares (Shimoyama, 2002; AGRIANUAL, 2005).

A batata é a cultura mais facilmente afetada por viroses. Mais de 40 viroses já foram descritas causando problemas na cultura, entretanto, o vírus do enrolamento da folha (*Potato leafroll virus*-PLRV), o vírus Y (*Potato virus Y*-PVY), o vírus X (*Potato virus X* - PVX) e o vírus S (*Potato virus S*- PVS) são os que merecem maior atenção, por ocorrerem com maior frequência na lavoura (Cupertino et al., 1970; Figueira & Pinto 1995; Souza Dias et al.; 1995 Souza Dias & Ramos, 2002; Figueira et al.; 2004, German, 2001)

O PVS é um membro do gênero *Carlavirus*, família *Flexiviridae*, que causa perdas de 10% a 15% quando está sozinho na planta (Wetter, 1971; Bemmster & De Bokx, 1987), mas, se estiver associado a outros vírus, essas perdas podem aumentar para até 77,55% (Marton et al., 1993). Possui dois grupos de estirpes, sendo uma comum, denominada de PVS<sup>o</sup>, que não possui vetor na natureza e a outra, denominada de PVS<sup>A</sup>, devido à sua origem Andina; pode ser transmitido por afídeos de modo não persistente, ainda que a uma taxa muito baixa, inferior a 20% (Čeřovská & Filigarová, 1995, 1981; Slack, 1981; 1983; Weidemann & Koenig, 1990; Fletcher, 1996; Wardrop et al., 1989).

Os sintomas causados pelo PVS, de modo geral, são percebidos somente em cultivares mais sensíveis, de modo que a maioria das cultivares comerciais geralmente apresenta sintomas latentes. Por isso, o uso de plantas indicadoras e de sorologia são importantes ferramentas para a identificação e a caracterização

de isolados. A técnica de diagnose considerada mais sensível, para a detecção do PVS, tem sido a DAS-ELISA (Maat & Huttinga, 1987, Kumar & Sing, 1999). O teste complementa as inspeções de campo, nos sistemas de certificação de sementes, pois, na grande maioria dos casos, os sintomas latentes não podem ser visualizados.

Os isolados do grupo PVS<sup>o</sup> podem causar lesões necróticas, mosaico e clorose em *S. comatum* e *S. dulcamara* (Takacs et al. 2001) e lesões cloróticas com diâmetros de 1-2 mm, aproximadamente, em *Chenopodium quinoa* e *Chenopodium amaranticolor*. Podem infectar sistemicamente plantas de *Nicotiana debneyi*, nas quais provocam clareamento das nervuras e mosaico.

Os do PVS<sup>A</sup> podem invadir sistemicamente *Chenopodium quinoa* (Slack, 1981; 1983, Weideamann & Koenig, 1990 Fletcher, 1996) e parecem também ser capazes de causar sintomas em tomate (*Lycopersicum esculentum* Mill.) (Fletcher, 1996; Matousek et al., 2000). Čerovská & Filigarová (1995) encontraram isolados causando mosaico e necroses em suas folhas, enquanto que Slack (1983) não observou nenhuma infecção de plantas de tomate quando fez inoculações mecânicas com estirpes do grupo PVS<sup>A</sup>. Essa provável incapacidade do PVS de infectar tomate já foi utilizada no passado como uma maneira de separar o PVS do PVM, em casos de infecções mistas (Bokx, 1987).

No Brasil, como o PVS não tem sido estudado devido à sua baixa incidência no campo, não se sabe quais são os isolados que têm sido introduzidos ultimamente, nem qual é o seu efeito nas principais cultivares de batata plantadas, principalmente se associado a outros vírus. Neste trabalho estudaram-se alguns isolados de diferentes origens, com a finalidade de determinar as suas características biológicas, como os sintomas induzidos em diferentes hospedeiras, incluindo plantas de batata, nas quais será também investigada a possível interação com o PVY. A diagnose do PVS, por meio do



teste DAS-ELISA, foi empregada para a confirmação da identidade do vírus bem como da sua presença em plantas com sintomas latentes.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Lavras (DFP/UFLA).

### 4.1 Origem dos isolados de PVS

Foram estudados cinco isolados de PVS, tendo quatro sido coletados em tubérculos de batata semente importada, enviados ao Centro de Indexação de Vírus de Minas Gerais para diagnose de vírus e um cedido por pesquisadores do IAC- Campinas-SP (Tabela 1).

**TABELA 1** Origem e nomenclatura dos isolados de PVS estudados. Lavras, MG, 2005.

<b>Origem</b>	<b>Cultivar</b>	<b>Isolado</b>
Canadá	Atlantic	ATL
E.U.A	Cal Red	CAL.R
E.U.A	Chipeta	CHIP
Campinas, SP	Duvira	DUV
E.U.A	Ida Rose	IDA.R

## 4.2 Manutenção do inóculo viral

Os isolados de PVS foram mantidos em tubérculos de batata infectados, mantidos em câmara fria para posterior plantio e obtenção de plantas infectadas para fonte de inóculo, sempre que necessário. Essas plantas foram analisadas por DAS-ELISA para PLRV, PVY, PVX e PVS, com a finalidade de descartar a possibilidade de infecções mistas. A multiplicação do inóculo em casa de vegetação foi feita por inoculação mecânica em plantas de *Chenopodium quinoa*.

Para o estudo de sintomas do vírus Y e sua interação com o vírus S em plantas de batata foi empregado um isolado do tipo necrótico (PVY<sup>N</sup>), proveniente da coleção de vírus do Departamento de Fitopatologia da UFLA. Esse isolado, que se encontrava armazenado a -80°C, foi multiplicado em plantas de fumo (*Nicotiana tabacum*) cv. Turkish NN (TNN), por meio de inoculação mecânica.

## 4.3 Investigação de sintomatologia em hospedeiros

O isolados de PVS foram inoculados mecanicamente nas seguintes espécies de plantas: *C. quinoa*, *C. amaranticolor*, *Phaseolus vulgaris*, *Lycopersicon esculentm* cv. Santa Clara, *Gomphrena globosa*, *Nicotiana rústica*, *Alternanthera tenella*, *Datura stramonium* e *Nicotiana tabacum*, cv. Turkish NN (TNN). As inoculações mecânicas foram realizadas em duas diferentes épocas do ano, maio e dezembro de 2004, empregando-se 20 plantas de cada espécie, com três repetições.

Na inoculação mecânica, o extrato foliar foi obtido por maceração das folhas frescas em almofariz, na presença do tampão fosfato de potássio (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) 1%, pH 8,0, na proporção 1 grama de tecido de folhas para 10 mL de

tampão (p/v)(Hiruki, 1974) e friccionado nas folhas das plantas-teste receptoras, previamente polvilhadas com carborundum (400 mesh). Todas as inoculações foram feitas separadamente, com cuidado necessário para não haver risco de contaminação. Posteriormente, as folhas foram lavadas com água corrente e as plantas mantidas em casa-de-vegetação até a avaliação final dos sintomas.

Após 30 dias todas as plantas foram submetidas ao teste sorológico DAS-ELISA para a diagnose do PVS e também de PLRV, PVY e PVX, para assegurar a ausência de infecções mistas.

#### **4.4 Investigação dos sintomas do PVS associado aos do PVY, em plantas de batata**

Plantas sadias de batata, das cultivares Atlantic, Ágata e Monalisa, foram obtidas pelo plantio de tubérculo previamente analisado pelo teste sorológico DAS-ELISA, para os vírus PLRV, PVY, PVX e PVS, para a confirmação da sua sanidade. Dez dias após a emergência, as plantas foram inoculadas mecanicamente, conforme já descrito acima, utilizando-se como solução extratora do inóculo o tampão fosfato 0,01M-pH 7, contendo sulfito de sódio na mesma molaridade e, como fonte de inóculo, as plantas de fumo infectadas com PVY<sup>N</sup>. Foram empregadas dez plantas com três repetições.

Aproximadamente 20 dias após a inoculação, quando as plantas já mostravam os sintomas da inoculação com o PVY, hastes de batata cultivar Duvira, infectadas com PVS, foram enxertadas em uma das hastes das cinco plantas de batata com mosaico causado pelo PVY, para investigar os sintomas de uma infecção mista de PVY e PVS. Após a emissão de novos brotos pela haste que recebeu a enxertia, eles foram avaliados visualmente e por DAS-ELISA, e fotografados.

As plantas de batata foram então mantidas em casa de vegetação até o final do ciclo, para colheita dos tubérculos. Após a colheita, os tubérculos foram etiquetados separadamente e submetidos a forçamento de brotação com bissulfureto de carbono ( $25\text{mL/m}^3$ ) por 72 horas. Após a emissão dos brotos, os tubérculos foram novamente checados por ELISA e plantados, a fim de se observar os sintomas secundários em plantas infectadas com o PVY, com o PVS e com o PVY + PVS. Tubérculos livres de vírus, das respectivas cultivares, foram plantados para a obtenção das plantas sadias que serviram como controle.

#### **4.5 Teste sorológico DAS-ELISA**

Na diagnose dos vírus anteriormente citados, pela técnica DAS-ELISA (Clark & Adams, 1977), foram utilizados anti-soros policlonais da empresa Bioreba, de acordo com as recomendações do fabricante. Os tampões utilizados foram preparados no laboratório, sendo: tampão de cobertura (carbonato bicarbonato  $0,025\text{M}$ , pH 9,6, contendo  $0,02\text{ g/l}$  de azida sódica); 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  $\text{MgCl}_2$ ,  $0,02\%$  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). 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  $405\text{ nm}$  no espectrofotômetro MRX (Dynatech). Foram consideradas positivas amostras cujas absorbâncias foram maiores ou iguais a duas vezes a média da absorbância do controle negativo.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Todos os isolados estudados reagiram positivamente com os anti-soros empregados para a diagnose do PVS por meio de DAS-ELISA e negativamente com os anti-soros contra PVX, PVY e PLRV, assegurando que não havia infecções mistas. Os resultados do teste de inoculação mecânica do PVS, nas hospedeiras empregadas, encontram-se na Tabela 2. Não foram notadas diferenças nas reações das plantas quando as inoculações foram realizadas em diferentes épocas do ano, com exceção dos isolados CAL.R e ATL, que induziram lesão local clorótica nas plantas de *Chenopodium amaranticolor* no mês de maio e não induziram nenhum sintoma em dezembro. Essas plantas sem sintomas foram também ELISA negativas. Não se pode descartar uma possível interferência da temperatura ambiente, que é mais elevada nessa época do ano, pois, sabe-se que o desenvolvimento de sintomas, causados pelo PVS nas plantas hospedeiras, pode ser afetado pela temperatura. Alguns autores observaram que as plantas infectadas pelo PVS mostram sintomas mais nítidos quando são mantidas a temperaturas mais amenas, em torno de 27°C (Hiruki, 1974, Bokx & Piron, 1978).

Fato interessante observado neste trabalho foi que, além do arroxamento na área internerval da face superior das folhas (Figura 1-A), constatou-se o aparecimento de anéis arroxeados na face inferior das folhas de tomateiros infectados com os isolados CAL.R, CHIP e IDA.R (Figura 1-B). Existem autores que utilizam o tomateiro para separar o PVS do PVM porque ele mostraria sintomas somente quando infectado com esse último vírus (Wetter, 1971; Slack, 1983). Outros, entretanto, já descreveram o tomateiro, cultivares Money maker e Rutgers, como suscetíveis ao PVS, reagindo com sintomas de mosqueado clorótico e lesão local necrótica mais mosqueado,

respectivamente (Fletcher, 1996). Entretanto, nunca foi descrito o aparecimento de anéis arroxeados.

O fato de cada autor empregar uma cultivar de tomate diferente para testar sua suscetibilidade ao PVS, poderia ser a causa da não uniformidade da reação aos isolados de PVS estudados. Por outro lado, a variabilidade dos isolados também poderia interferir na resposta das hospedeiras, pois, mesmo nesse trabalho, o tomateiro cv. Santa Clara reagiu de modo diferente aos isolados de CAL.R, CHIP.R e IDA.R, mostrando uma clara distinção na interação patógeno-hospedeira entre estas e as ATL e DUV. Como os três primeiros isolados, apesar de terem sido detectados em cultivares de batata diferentes, vieram do mesmo país/região, provavelmente devem ser semelhantes entre si.

Uma possível infecção mista dos isolados de PVS estudados com o PVM foi descartada, devido à reação das plantas inoculadas. Cultivares de *Phaseolus vulgaris* geralmente reagem ao PVM com lesões locais e anéis cloróticos ou pontos necróticos em *Gomphrena globosa* (Hiruki, 1970; German, 2001). Para complementar os estudos aqui iniciados, deverão ser realizados outros, de virologia molecular e de transmissibilidade por meio do vetor.

O resultado das inoculações do vírus Y da batata e do vírus S da batata, separadamente e em conjunto nas cultivares Atlantic, Ágata e Monalisa, está representado nas Figuras 2 a 6. Pode-se observar que quando as hastes infectadas com o PVS foram enxertadas nas hastes das plantas infectadas com o vírus Y, os brotos emitidos após a enxertia apresentaram sintomas muito mais drásticos, evidenciando uma possível interação entre esses dois vírus (Figuras 2, 3 e 4).

A comprovação dessa interação foi feita quando foram plantados os tubérculos das cultivares Ágata e Monalisa, infectados com cada vírus, separadamente e com ambos os vírus ao mesmo tempo (Figuras 5 e 6). As

plantas infectadas apenas com o PVS, independentemente da cultivar, praticamente não podem ser diferenciadas das plantas saudáveis, indicando uma infecção do tipo latente, uma vez que as plantas foram ELISA positivas quando testadas para esse vírus. Entretanto, tanto na cv. Ágata como na cv. Monalisa, os sintomas mostrados pelas plantas infectadas com PVY+PVS foram muito mais drásticos que quando estavam infectadas apenas com o PVY. As plantas da cv. Ágata mostraram mosaico com pouco ou nenhuma rugosidade quando infectadas com o PVY. Quando infectadas como PVY+PVS elas mostraram mosaico mais intenso e enrugamento, com visível diminuição da área foliar na parte apical da planta (Figura 5). A interação entre esses vírus foi mais drástica na cv. Monalisa, na qual esse vírus causou diminuição no porte da planta e deformações foliares (Figura 6).

Essé é o primeiro experimento mostrando a interação entre o PVS e o PVY em cultivares de batata economicamente importantes no Brasil. Na atualidade, as cultivares Atlantic, Ágata e Monalisa estão entre as mais plantadas. Existe uma polêmica, levantada principalmente por parte dos países exportadores de batata, sobre a importância do PVS, ou seja, se ele realmente estaria associado a perdas, devido ao fato de provocar infecção latente nas plantas. Esse argumento tem sido apresentado principalmente, por países que não conseguem produzir batata com baixos índices de PVS, em locais onde ele é praticamente endêmico e muito comum em locais onde cortam-se os tubérculos semente para plantio. Marton et al. (1993) observaram que plantas de batata cv. Achat, quando infectadas apenas com o PVS, apresentaram 49,29% de redução na produção e, quando infectadas com PVS + PLRV, essa redução aumentou para 77,5% e 51,47% na cultivar Baronesa.

Este trabalho desenvolvido com as cultivares economicamente importantes para o Brasil, na atualidade, vem acrescentar a informação de que existe também interação entre o PVS e o PVY, capaz de provocar o aumento da

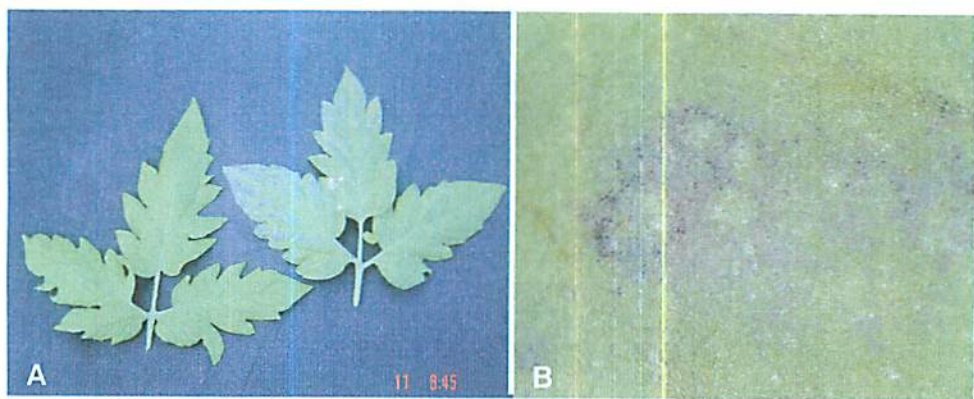


severidade de sintomas nas plantas, o que certamente deverá causar diminuição na sua produção. Isso mostra que o PVS deve ser evitado nos campos produtores de batata do Brasil, pois os principais vírus que aqui ocorrem são o PVY e o PLRV. Com a existência das estirpes andinas (PVS<sup>A</sup>), transmissíveis pelo vetor, o risco da sua introdução no Brasil é real e esse vírus poderia se tornar um grande problema para o bataticultor brasileiro.

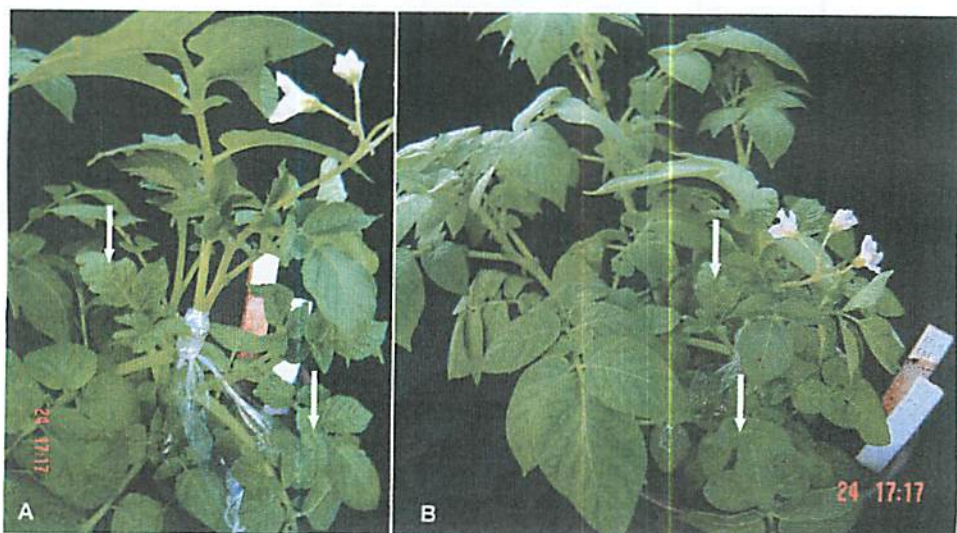
**TABELA 2** Sintomas apresentados pelas espécies de plantas inoculadas mecanicamente com cinco isolados do *Potato virus S.* em duas épocas do ano. Lavras-MG, 2005.

Espécies inoculadas	ATL		CAL.R		CHIP		DUV		IDA.R	
	Maio	Dezembro	Maio	Dezembro	Maio	Dezembro	Maio	Dezembro	Maio	Dezembro
<i>C. quinoa</i>	LC	LC	LC	LC	LC	LC	LC	LC	LC	LC
<i>C. amaranticolor</i>	LC	SS	LC	SS	LC	LC	LC	LC	LC	LC
<i>G. globosa</i>	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS
<i>L. esculentum</i>	SS	SS	A/AA	A/AA	A/AA	A/AA	SS	SS	A/AA	A/AA
<i>P. vulgaris</i>	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS
<i>N. rustica</i>	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS
Batata cv. Agata	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS
<i>A. tenella</i>	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS
<i>D. stramonium</i>	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS
<i>Nicotiana tabacum</i> (cv. Turkish NN)	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS

LC = lesão clorótica; A = arroxamento; SS = sem sintomas; AA = anéis arroxeados



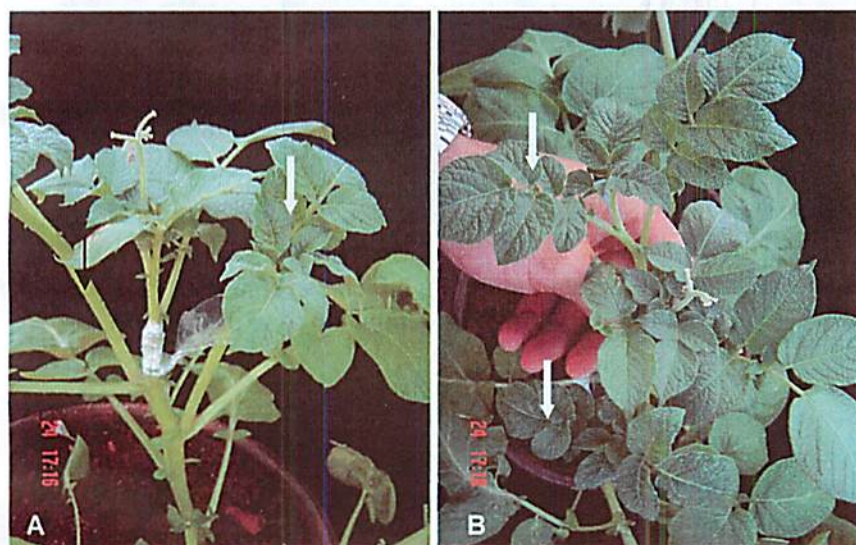
**FIGURA 1.** Sintomas de arroxamento internerval induzidos pelo PVS (isolado IDA) na face superior de folhas de *Lycopersicum esculentum* cv. Santa Clara, à direita, e folha sadia à esquerda (A). Formação de anéis arroxeados na parte abaxial da folha (B).



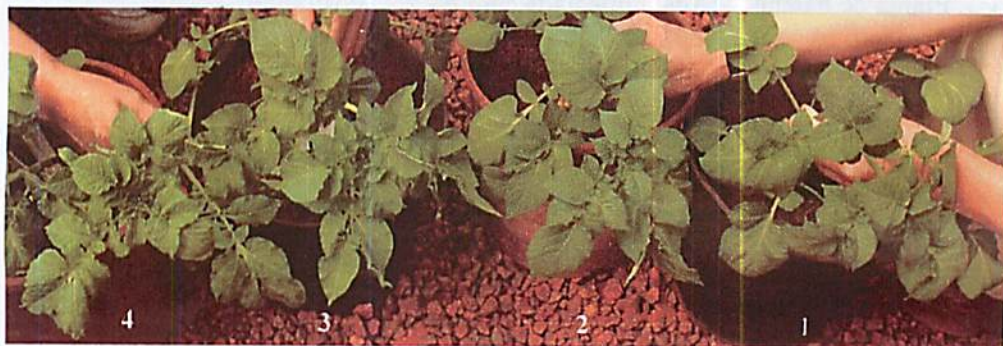
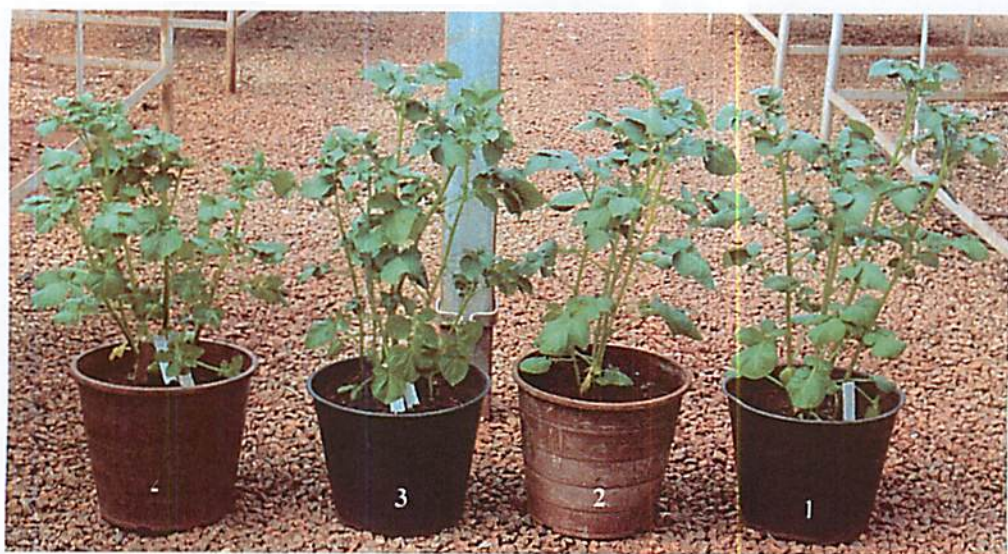
**FIGURA 2.** Planta de batata cv. Atlantic infectada com PVY N mostrando aumento na severidade dos sintomas após a enxertia de hastes de batata cv. Duvira infectadas com PV S.



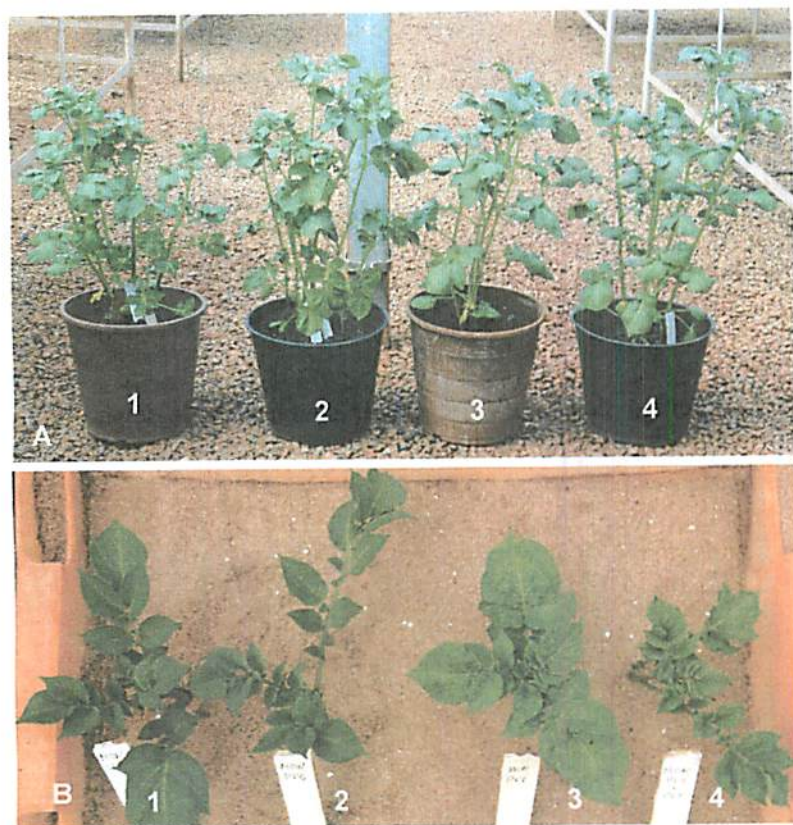
**FIGURA 3.** Planta de batata cv. Ágata infectada com PVY<sup>N</sup> mostrando aumento na severidade dos sintomas após enxertia de hastes de batata cv. Duvira infectadas com PVS.



**FIGURA 4.** Plantas de batata cv. Monalisa infectada com PVY<sup>N</sup>, A e B mostrando aumento na severidade dos sintomas após a enxertia de hastes de batata cv. Duvira infectadas com PVS.



**FIGURA 5.** A: plantas de batata cv. Ágata sadias (1), infectadas com PVS (2), com PVY (3) e com PVS+PVY (4); B: detalhe do topo das plantas acima.



**FIGURA 6.** A: plantas de batata cv. Ágata sadia (1), infectadas com PVS(2), com PVY(3) e com PVS + PVY (4); B: detalhe do topo das plantas acima.

## 6 CONCLUSÕES

1. Plantas de tomate (*Lycopersicon sculentum* Mill) foram eficientes para discriminar os isolados CAL.R, CHIP e IDA.R dos demais, reagindo com arroxamento na face superior das folhas e anéis arroxeados na parte inferior da folha.

2. O PVS pode interagir com o PVY e causar sintomas mais severos quando presente, em infecções mistas, nas plantas das cultivares Ágata, Monalisa e Atlantic.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGRIANUAL. **Anuário da Agricultura Brasileira**. São Paulo, FNP: Consultoria e Comércio, 2005. 2002
- BEEMSTER, A.B.R.; DE BOKX. Survey of properties and symptoms. In: De BOKX, J.A.; Van der WANTS, (Ed.). **Viruses of potato and seed potato production**. 2.ed. Wageningen: Pudoc, 1987. p. 84-113.
- BOKX, J.A.; PIRON, P.G.M. Detectability of *Potato virus S* in fiel-grown plantas. **Medicine Fac.Landbouw Rijksuniv.Gent., Wagening**, v.43, n.2, 1978.
- BOKX, J.ZA. Biological properties. In: BOKX, J.ZA.; Van der WANTS, (Ed.). **Viruses of potatoes and seed-potato production**. 2.ed. Wageningen:Pudoc, 1987. p.58-82.
- ČEŘOVSKÁ, N.; FILIGAROVÁ, M.; Specific detection of Andean strain of *Potato virus S* by monoclonal antibodies. **Annual Applied Biologist**, Prague, p. 87-93, May 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.
- 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.
- FIGUEIRA, A.R.; PINTO, A.C.S. Estirpe necrótica do vírus Y da batata em sementes importadas está causando sérios problemas ao bataticultor mineiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.20, p.299, ago.1995. Suplemento.
- 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, Agos. 2004. Suplemento.
- FLETCHER, J. D.; *Potato virus S<sup>A</sup>* – Characteristics of an isolate from New Zealand. **New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science**, New Zealand, v.24, p.335-339, Christchurch, New Zealand 1996.



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

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

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

KUMAR, S.; SING, S. Sensitivity of polyvalent DOT-ELISA in comparison to DOT and DAS-ELISA for detection of potato viruses. **Journal of the Indian Potato Association**. v.26,n.1/2, p.39-42. 1999.

MAAT, D.Z. & HUTINGA, H. Serology.. In: BOKX, J.ZA.; Van der WANTS, (Ed.). **Viruses of potatoes and seed-potato production**. 2.ed. Wageningen:Pudoc,1987.p.84-113.

MÁRTON, L. et al. Degenerescência devido a viroses em cultivares de batata. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.11, p.82,1993. Resumo.

MATOUSEK, J.; et al. 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

SHIMOYAMA, N. Y. Os efeitos da crise Argentina sobre o agribusiness brasileiro In: \_\_\_\_\_. **Agribusiness brasileiro e o desafio do comércio internacional**. Jan 2002 Disponível em: <[www.abagbrasil.com.br/agr\\_br\\_desafios\\_inter.pdf](http://www.abagbrasil.com.br/agr_br_desafios_inter.pdf)> Acesso em: 12 jan.2005.

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

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.

SOUZA DIAS, J.A.C.; TRISTÃO, J.F.; MIRANDA, H.S. Vírus Y da batata-semente cv Atlantic : alteração na epidemiologia da virose de São Paulo e Paraná. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.20, p.320, Ago.1995. Suplemento.

SOUZA DIAS, J.A.C. & RAMOS, V.J. Potato vírus S na Estação experimental de Agronomia de Itararé (EEAI): possível relação com cv. 'Atlantic' de origem canadense. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v.27, p.S213, ago.2002. Suplemento.

TAKACS, A.P. et al. New hosts virus relations between different *Solanum* species and virus. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON CROP PROTECTION, 53., 2001, Belgium. *Proceeding Mededelingen Faculteit Landbouwkundige en Toegepaste Biologische Wetenschappen*.

WARDOP, E.A.; GRAY, A.B.; SINGH, R.P.; PETERSON, J.F. 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.resumo CAB

WETTER, C. *Potato virus S*. *Description of Plant Viruses*. n° 60. Commonw. Mycol.Inst./Assoc.Appl.Biol.,Kew,Surrey,England. 1971. .

## **CAPÍTULO 3**

**Características moleculares do gene da capa protéica de um isolado do vírus S da batata (*Potato virus S*) no Brasil**

## 1 RESUMO

BARROCAS, Ellen Noly. Características moleculares do gene da capa protéica de um isolado do vírus S da batata (*Potato virus S* -PVS) no Brasil. In: \_\_\_\_\_. **Aspectos biológicos e moleculares do vírus S da batata (*Potato Virus S* - PVS)**. 2005. Cap. 3, p.48-64. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.<sup>1</sup>

Foi estudado o fragmento genômico, referente aos 296 aminoácidos da capa protéica do isolado de PVS aqui denominado de IDA. R, detectado em sementes de batata importadas dos Estados Unidos. Esse fragmento com 888pb, foi amplificado por RT-PCR, utilizando-se primers desenhados para essa finalidade, clonado e seqüenciado, sendo a seqüência de nucleotídeos e aminoácidos comparados com 18 isolados de PVS, disponíveis no banco de genes. No alinhamento de nucleotídeos a menor identidade entre o isolado estudado e os do banco de genes foi de 80% com o isolado AF493951 proveniente da Inglaterra e D00461 e a maior identidade foi de 95% com o isolado Y079209, (isolado Fujian) da China. No alinhamento de aminoácidos, a maior identidade foi de 100% com o isolado AF493950, da Inglaterra e as menores identidades foram com os isolados AF493950 (93%) e D00461(94%), ambos PVS<sup>A</sup>.

As árvores filogenéticas baseadas na seqüência de aminoácidos e na seqüência de nucleotídeos apresentaram tendências semelhantes, com o IDA. R agrupando-se separadamente dos isolados AF493951 e D00461 que são do tipo Andino (PVSA). Isso demonstra que o isolado IDA.R deve ser do tipo PVS<sup>O</sup>.

---

<sup>1</sup>Orientadora: Antonia dos Reis Figueira- UFLA

## 2 ABSTRACT

BARROCAS, Ellen Noly. Molecular traits of the coat protein gene from one *Potato virus S* isolate in Brazil. In: **Biological and molecular aspects of *Potato Virus S* (PVS) 2005**. Chap. 3, p.48-64. Dissertation (Master Program in Phytopathology) – Federal University of Lavras, Lavras, MG.<sup>1</sup>

The genome fragment of one *Potato virus S* isolate, named IDA.R, containing 894pb, from the nucleotide 9 to 902, downstream the coat protein gene, were amplified by RT-PCR, cloned, sequenced and analyzed. The alignment of the nucleotides and amino acids of IDA.R isolate with 18 PVS isolates from GenBank, and the phylogenetic tree, using the Mega 2.1 program, were performed. The nucleotide identity, seen in the alignment, ranged from 80% with AF593951 isolate from UK and also with D00461 isolate from Canada, to 95% with the Fujian isolate (Y079209), from China. The highest identity, in the amino acids alignment, was 100% with the AF394950 isolate, from UK, and the two smaller were 93% with the AF493951, and 94% with D00461 isolates, which are both PVS<sup>A</sup>. The phylogenetic trees based on the amino acid and nucleotide sequences showed similar pattern, with IDA.R and AY079209 grouped together and close to other PVS<sup>O</sup> isolates. The AF493951 and D00461 isolates, which are Andean type strains (PVS<sup>A</sup>) were grouped in a separate way, indicating that IDA.R may be a PVS<sup>O</sup> type isolate.

---

<sup>1</sup>Major professor: Antonia dos Reis Figueira – UFLA

### 3 INTRODUÇÃO

O PVS é uma espécie do gênero *Carlavirus*, família *Flexiviridae*. É considerado um dos vírus mais comuns, ocorrendo em todos os lugares onde existe a cultura da batata no mundo (Heldák, 2001). Muitos países possuem campos com alta incidência do PVS (Talens, 1979; Wilson & Jones, 1990; Theoduloz, 1992, De Estrada, 1993; Omer & El-Hassan, 1994; Fletcher, 1996; Heldák, 2001; Dedic et al., 2004) sendo descritas medidas e programas direcionados à promoção de um controle eficiente desse vírus no campo (Fletcher, 1996; Dedic et al. 2004).

Apesar de já ter sido detectado no Brasil desde que a batata começou a ser cultivada, o PVS nunca causou problemas, pois a sua ocorrência sempre foi rara e sem registros de altas incidências nos campos de sementes. Isso porque os países tradicionais que exportavam batata-semente para o Brasil geralmente enviavam sementes isentas desses vírus. Mais recentemente, a possibilidade de importação de sementes dos países membros do MERCOSUL, que geralmente admitem incidências mais altas de PVS nas sementes, levantou a discussão sobre a necessidade de se controlar o PVS no Brasil, levando a sua inclusão na lista de pragas não quarentenárias regulamentadas. A detecção de altos índices de PVS em sementes importadas de outros países, como Canadá e Estados Unidos (Souza Dias et al., 2001; Figueira et al., 2004), reforçou essa atitude.

O fato de a maioria dos isolados de PVS encontrados no campo ser do tipo comum (PVS<sup>O</sup>), faz com que os métodos de controle baseiem-se no uso de sementes sadias. Entretanto, após a detecção da estirpe Andina (PVS<sup>A</sup>), que pode ser transmitida por afídeos (Slack et al., 1981; 1983), muitos autores têm levantado a possibilidade da re-infecção. O problema é frequentemente observado quando sementes isentas do vírus S da batata são plantadas mas é

observado quando sementes isentas do vírus S da batata são plantadas mas é posteriormente diagnosticado, indicando que o vírus pode estar associada à disseminação através do vetor (Halm et al. 1981; Weidemann, 1986; McDonald, 1987). Desde então houve um aumento no interesse por este vírus, sendo hoje considerado um dos vírus filamentosos mais importantes da Europa.

O PVS possui partícula alongada e flexuosa, medindo 650x 12 nm. Seu genoma é constituído por um RNA de fita simples, positivo (ssRNA+), com 7,5 Kb (Foster, 1991) que codifica seis proteínas. Dentre elas, a proteína capsidial (CP), de 34 Kda, tem sido a mais utilizada em estudos filogenéticos e também na identificação de estirpes e de genes de resistência ao vírus S e (Foster, 1991; MacKenzi & Tremaine, 1990). O sequenciamento dos nucleotídeos da região genômica do PVS, responsável pela codificação dessa proteína, possibilita a determinação da sua taxonomia e do relacionamento com outros isolados, além de indicar a sua provável origem geográfica.

Em virtude do PVS ser pouco estudado no Brasil, não existem relatos sobre as características genômicas dos isolados que aqui ocorrem. Por isso o objetivo deste trabalho foi clonar e sequenciar o segmento genômico responsável pela codificação da CP, de um isolado de PVS denominado IDA, detectado em sementes de batata indexadas no Centro de Indexação de Vírus de Minas Gerais, com a finalidade de realizar estudos taxonômicos em comparação com outros isolados disponíveis no banco de genes.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados em casa de vegetação e no Laboratório de Virologia Molecular no Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Lavras (DFP/UFLA).

### 4.1 Origem e manutenção do isolado

O isolado de PVS estudado foi detectado no Centro de Indexação de Vírus de Minas Gerais, em amostras de batata-semente da cultivar Idarose, importada dos Estados Unidos. Ele foi diagnosticado pelo teste sorológico DAS-ELISA e a sua manutenção foi feita pela multiplicação dos tubérculos infectados e por inoculação mecânica em plantas de *Chenopodium quinoa*. Todas as plantas de batata, provenientes dos tubérculos infectados com PVS, foram testadas por DAS-ELISA para os vírus do enrolamento da folha (*Potato leafroll virus* - PLRV), vírus X (*Potato virus X* - PVX) e vírus Y (*Potato virus Y* - PVY) para descartar a possibilidade de infecções mistas.

A inoculação mecânica foi feita friccionando-se o extrato das folhas infectadas de batata, obtido por maceração das mesmas em almofariz, na presença de tampão fosfato de potássio ( $K_2HPO_4$ ) 1%, pH 8,0, (temperatura ambiente), na proporção 1 grama de tecido foliar para 10 mL de tampão (p/v)(Hiruki, 1974). As folhas estavam previamente polvilhadas com carborundum. Em seguida, as folhas foram lavadas com água corrente e as plantas mantidas em casa de vegetação.



## 4.2 Extração do RNA total

A extração de RNA total foi seguida o protocolo de Gibbs & Mackenzie (1997). Folhas jovens, infectadas (0,1g), foram maceradas em almofariz na presença de nitrogênio líquido e, ao pó obtido, foram adicionados 500µL de tampão (10 mM Tris-HCl pH 8,0; 1 mM EDTA pH 8,0; 2 M NaCl, 0,005% BSA). Após agitação o extrato foliar foi centrifugado a 14.000 rpm por 10 minutos, descartando-se o sobrenadante. Todas as centrifugações foram feitas na Centrífuga Eppendorf 5402. Ao precipitado foram adicionados 600µL de tampão CTAB (2% CTAB contendo 1,4M NaCl e 0,5% de β-mercaptoethanol), o tubo foi agitado em vortex e incubado a 55°C por 30 minutos. Após a incubação, foram acrescentados 400µL de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1), o tubo foi novamente agitado em vortex e centrifugado a 14.000 rpm por 10 minutos. A fase aquosa foi transferida para um novo tubo e a ela adicionou-se 1/10 volume de acetato de amônio 7,5M e 1 volume de isopropanol. Após nova agitação a amostra foi colocada a -80°C por 10 minutos para a precipitação do RNA e centrifugada a 14.000 rpm por 10 minutos, descartando-se o sobrenadante. O precipitado foi lavado com etanol a 70%, secado a vácuo por 5 minutos e ressuspendido em 50 µL de água ultrapura tratada com diethyl pyrocarbonate (DEPC). O RNA total obtido foi analisado por eletroforese em gel de agarose 0,7%.

### 4.2.3 Transcrição reversa e PCR

Os *primers* empregados foram desenhados especialmente para este trabalho, com base nas seqüências depositadas no banco internacional de genes para a região da capa protéica do PVS. O *primer* 5'→3' (*sense*) foi desenhado

Iniciando-se no código de iniciação (nono nucleotídeo) do gene da proteína capsidial 5'ATGCCGCCYAAACCRGATCCRWCWAGYTCA 3', sendo: Y= T ou C, R= G ou A ou , W= A ou T e o 3'→5'(antisense) foi desenhado iniciando-se no nucleotídeo nº 902, de modo a obter um fragmento de 894 pb: 3'GGT CTG CCT TCA TTG 5'. Como a maioria das capas protéicas dos isolados de PVS possui entre 885 e 893 nucleotídeos, esses *primers* permitiriam a amplificação da seqüência completa do gene da capa protéica.

Para a síntese inicial do cDNA foram utilizados 5µL do RNA total, 1µL do *primer antisense* (na concentração de 10 pM) e 6µL de água tratada com DEPC. O material foi incubado a 70°C por 10 minutos e imediatamente transferido para o gelo por 10 minutos. Em seguida foram adicionados 4 µL de RT buffer 5X (250 mM Tris-Hcl, pH 8,3 a 25°C; 375 mM KCl, 15 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM DTT), 1 µL de dNTPs 10 mM, 0,5 µL da enzima transcriptase reversa (M-MLV). Essa mistura foi incubada a 37°C por 1 hora e por 15 minutos a 70°C. Após a obtenção do cDNA, este foi amplificado por PCR, utilizando-se 5µL do cDNA, 5 µL do 10X tampão da PCR, 3 µL de MgCl<sub>2</sub> (25 mM), 1µL dNTP (10 mM), 2,5 µL do *primer sense* (a10 pM), 2,5 µL do *primer antisense* (a 10 pM), 1µL da Taq DNA polimerase e 30 µL de água ultra pura tratada com DEPC.

Para a reação de PCR foram empregados 35 ciclos, sendo: 94 C ° por 40 segundos, 53 C ° por 55 segundos e 72° C por 2 minutos. Alíquotas de 5 µL destas reações foram analisadas por eletroforese em gel de agarose (0,7%).

#### 4.3 Clonagem e seqüenciamento

Os fragmentos amplificados por RT-PCR foram clonados no vetor utilizando o "Kit" TOPO TA (Invitrogen, San Diego, EUA), seguindo as recomendações do fabricante e utilizando as técnicas de Sambrook (1989). Foi

utilizado 1  $\mu\text{L}$  do produto fresco da PCR, 1  $\mu\text{L}$  da solução salina diluída, 1  $\mu\text{L}$  do plasmídeo vetor TOPO e 2  $\mu\text{L}$  de água estéril. A reação foi incubada por 5 minutos à temperatura ambiente e 2  $\mu\text{L}$  foram transferidos para tubos contendo células competentes de *E. coli*, para a transformação das mesmas. Os tubos foram colocados por 30 minutos no gelo, 30 segundos no banho-maria a 42°C e novamente no gelo por 5 minutos. Após a adição de 280  $\mu\text{L}$  do meio SOB (2% triptona, 0,5% extrato de levedura, 10mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub> e 10mM MgSO<sub>4</sub>), o material foi incubado sob agitação a 37°C por 30 minutos. Para o crescimento das colônias, utilizaram-se placas de petri com meio sólido LB- kanamicina (1% triptona, 0,5% extrato de levedura, 1% NaCl em água deionizada, pH 7,0, 1  $\mu\text{L}$  kanamicina/ mL do meio), espalhando-se, antes da semeadura, 25  $\mu\text{L}$  de X-GAL/placa. Em seguida, 150  $\mu\text{L}$  da suspensão de células bacterianas foram espalhadas em cada placa, incubando-se, em seguida, a 37°C por 14-16 horas.

As colônias transformadas (brancas) foram individualmente transferidas para os tubos contendo 5,0 mL do meio LB líquido, e incubados, com agitação, a 37°C, por 14-16 horas. Os plasmídeos recombinantes foram purificados pelo método da lise alcalina (Sambrook et al., 1989). Transferiu-se 1,5 mL de suspensão de células bacterianas para os tubos de microcentrífuga e centrifugados a 14.000 rpm por 10 segundos. O sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspenso em 300  $\mu\text{L}$  do tampão TENS (0,5, mL Tris-HCl 1M pH8,0; 0,5 mL NaOH 10N, 1,25 mL 20% SDS; 50 mL de água ultrapura) e posteriormente agitado em vortex. Em seguida, adicionaram-se 150  $\mu\text{L}$  de NaOAc 3M, pH 5,2, agitou-se novamente em vortex, e centrifugou-se por 5 minutos, descartando-se o precipitado. Ao sobrenadante foram adicionados 5  $\mu\text{L}$  de RNase (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), incubando-se a 37°C por 30 minutos. Após esse período, foram adicionados 200  $\mu\text{L}$  de PCI (50 mL de fenol saturado, 50 mL de clorofórmio e 1,2 mL de álcool isoamílico), os tubos foram centrifugados por 5

minutos e a fase aquosa foi transferida para um novo tubo. O DNA foi precipitado com 900  $\mu$ L de etanol absoluto, resfriado em congelador, centrifugando-se a 14.000 rpm por 5 minutos. O precipitado foi lavado com etanol a 70% e o precipitado foi secado a vácuo e ressuspenso em 30  $\mu$ L de água ultrapura tratada com DEPC. O DNA foi analisado por eletroforese em gel de agarose a 0,7%. Para comprovar o tamanho do fragmento clonado, esse DNA foi submetido à clivagem com a enzima de restrição *EcoR1* e novamente avaliado por eletroforese em gel de agarose a 0,7%. O DNA foi então enviado para a Universidade Federal de Viçosa, onde foi processado para o sequenciamento.

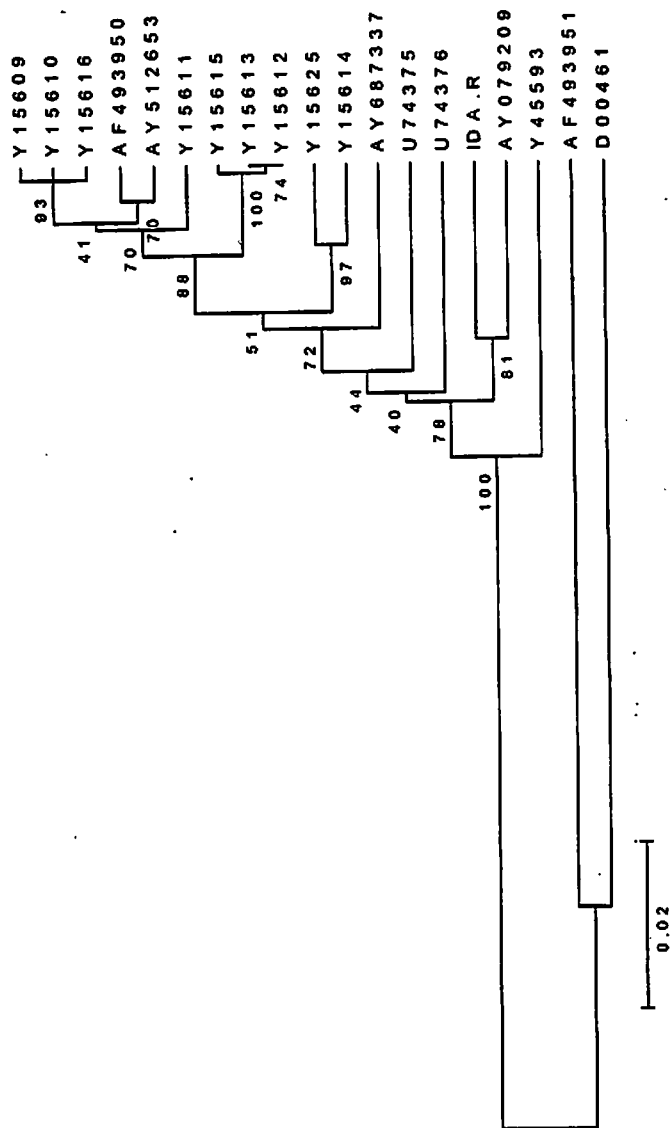
#### 4.4 Análise da seqüência

Os cromatogramas foram cuidadosamente avaliados e as seqüências foram corrigidas e analisadas pelo Programa BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>). Com auxílio do programa CLUSTALW (<http://clustalw.genome.jp>) foram realizados alinhamentos múltiplos com outros isolados de PVS, disponíveis no “GenBank”. As árvores filogenéticas foram obtidas por meio do programa MEGA 2.1 ([www.megasoftware.net](http://www.megasoftware.net)) com bootstrap, considerando valores superiores de 2.000 repetições.

## 5 RESULTADOS DISCUSSÃO

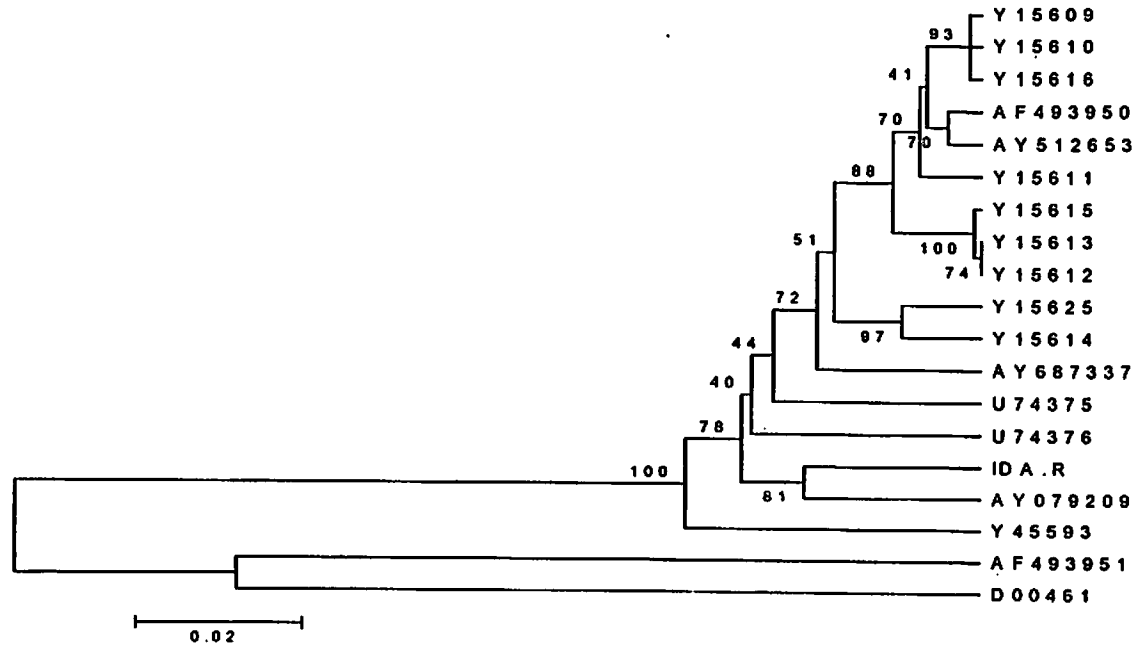
Foi possível obter a seqüência dos 894 nucleotídeos referentes aos 294 aminoácidos da região CP do isolado IDA.R. O alinhamento dos nucleotídeos desse isolado com os 18 isolados utilizados para comparação, provenientes do banco internacional de genes (Tabela 1, Figura 1.A), mostrou que ele está mais estreitamente relacionado com os do tipo PVS<sup>O</sup>, tendo a maior identidade (95%) sido com o isolado AY79209 (isolado Fujian) da China. Porém é preciso considerar que o isolado não tem a seqüência da capa completa no banco de genes. A menor identidade (80%) foi com o isolado AF43951 da Inglaterra e o isolado D00461, ambos do tipo PVS<sup>A</sup>. No alinhamento de aminoácidos (Tabela 2, Figura 2.A), as menores identidades também foram com dois isolados do tipo PVS<sup>A</sup>, o AF493950 (93%) da Inglaterra e o D00461 (94%). A maior identidade de aminoácidos foi com o isolado AY070209 (100%) da China.

As árvores filogenéticas obtidas para os nucleotídeos e para os aminoácidos (Figuras 2 e 3) também indicam que o isolado IDA.R agrupa-se com os isolados PVS<sup>O</sup>, separadamente dos isolados AF 493951 e D00461, que são descritos como pertencentes à estirpe andina, que é transmitida por afídeos de modo não persistente (Čerovská & Filigarová, 1994). Os autores que já estudaram essas duas estirpes encontraram as maiores diferenças nas proteínas da CP protéica e na proteína 11K, que parece estar relacionada com a transmissão do vírus através de afídeos (Foster & Mills, 1992; Foster, 1992, Matousek et al. 2000). Os resultados aqui obtidos sugerem que, provavelmente, o isolado IDA.R é do tipo PVS<sup>O</sup>.



**FIGURA 1- Árvore filogenética obtida com base nas sequências denucleotídeos da região da capa proteica do isolado IDA.R com dezoito isolados do banco de genes.**

Os valores de bootstrap foram obtidos através do programa MEGA ver 2.1, com 2.000 repetições, Lavras-MG, 2003



**FIGURA 1-** Árvore filogenética obtida com base nas sequências denucleotídeos da região da capa proteica do isolado IDA.R com dezoito isolados do banco de genes.

Os valores de bootstrap foram obtidos através do programa MEGA ver 2.1, com 2.000 repetições, Lavras-MG, 2003

## 6 CONCLUSÃO

1. O isolado IDA.R apresentou alta identidade com todos os isolados do tipo PVS°, indicando pouca variabilidade entre os membros desse grupo.
2. O isolado IDA.R apresentou baixa identidade e se agrupou separadamente das estirpes andinas, indicando que ele deve ser do tipo PVS°.



## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ČEŘOVSKÁ, N.; FILIGAROVÁ, M.; Specific detection of Andean strain of *Potato virus S* by monoclonal antibodies. **Annual Applied Biologist**, Prague, p. 87-93, May, 1994.
- DE ESTRADA, Y. R. Incidencia de los virus PVX, PVS, PVY y PLRV pérdida de rendimientos en semillas de papa nacional e importada en Venezuela. **Rev. Fac. Agron. Maracay**, v.19, p.102-103, 1993.
- DEDIC, P. et al. *Potato virus S* (PVS) and its elimination from potato maintenance breeding in Czech Republic. In: EAPR VIROLOGY SECTION MEETING, 12, 2004, Rennes, France. **Abstracts...** Rennes, France: INRA. Poster 59, p.94.
- 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. Suplemento.
- FLETCHER, J.D. *Potato virus S<sup>A</sup>* – Characteristics of an isolate from New Zealand. **New Zealand journal of Crop and Horticultural Science**, 1996, v.24, p.335-339, 1996.
- FOSTER, G.D. Molecular variation between ordinary and Andean strains of *Potato virus S*. **Research in Virology**, v.142, p.413-416, 1991.
- FOSTER, G.D. The structure and expression of the genome of *Carlavirus*. **Research in Virology**, Paris, v.143, p.103-112, 1992.
- FOSTER GD, MILLS PR. The 3'-nucleotide sequence of an ordinary strain of *Potato virus S*. **Virus Genes**, Leicester, UK, v.6, n.3, p.213-320, Aug. 1992.
- GIBBS A. & MACKENZIE A. A primer pair for amplifying part of the genome of all potyvirids by RT-PCR. **Journal of Virological Methods** v.63, p.9-16, 1997.
- HAHM, Y.; SLACK, S.A.; SLATTERY, R.J. Reinfection of potato seed stocks with *Potato virus S* and potato virus X in Winconsin. **American Potato Journal**, v.58, p.117-125, 1981.

HELDÁK, J. Detection of *Potato virus S* by RT-PCR in potato regenerants derived from in vitro heat-treated shoot tips. In: INTERNACIONAL SCIENTIFIC CONFERENCE ON THE OCCASION OF THE 55<sup>TH</sup> ANNIVERSARY OF THE SLOVAK AGRICULTURAL UNIVERSITY IN NITRA, 2001. *Acta Fytotechnica et Zootechnica*, v.4, 2001. Special Number.

MACKENZIE, D.J., TREMAINE, J.H. Transgenic *Nicotiana debneyii* expressing viral coat protein are resistant to potato virus S infection. *Journal of General Virology*, n.71, v.9, p.2167-2170, 1990.

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

MCDONALD, J.G. Comparative levels of potato viruses S and Y infection of microplants and tuber-propagated plants in the field. *American Potato Journal*, v.64, p.517-521, 1987.

OMER, A.D. & EL-HASSAN, S.M. Location and cultivar variations in the prevalence of potato virus disease in the Sudan. *Trop. Agric., Trinidad*, v.71, n. 3, July, 1994.

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

SLACK, S.A. Identification of an unusual strain of *Potato virus S* in North America. *Phytopathology*, v.71, n.2, p.255, 1981. Abstract.

SLACK, S.A. Identification of an isolate of the Andean strain of *Potato virus S* in North America. *Plant Disease*, v.67, n.7, p.786-789, July 1983.

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. Resumo.

TALENS, T.T. Potato viruses in the Philippines: Detection and identification of potato viruses X, S, and Y. *Philippine Agriculturist*, v.62, p.144-148, Apr./June 1979.

**THEODULOZ, C. et al.** The incidence of potato virus X, Y, and S in the Chilota potato collection. **American Potato Journal**, v.69,p 827-830, 1992.

**WEIDEMANN, H.L.** The spread of potato viruses S and M under field conditions. **Potato Research**, v.29, p.116, 1986. Summary.

**WILSON, C.R. & JONES, R.A.** Virus content of seed potato stocks produced in a unique seed potato production scheme. **Annual Applied Biology**, v.116, p.103-109, 1990.

## ANEXOS

TABELA 01	Porcentagem de identidade de nucleotídeo da região da capa protéica do isolado IDA.R entre diferentes isolados de PVS, obtidos através do alinhamento múltiplo utilizando CLUSTALW.....	66
TABELA 02	Porcentagem de identidade de aminoácidos da região da capa protéica do isolado IDA.R entre diferentes isolados de PVS, obtidos através do alinhamento múltiplo utilizando CLUSTALW.....	67
TABELA 03	Denominação e caracterização de isolados de PVS obtidos no banco de genes, na região referente a capa protéica.....	68
FIGURA 1A	Alinhamento da seqüência de nucleotídeos do gene da capa protéica do isolado IDA.R com isolados disponíveis no banco de genes.....	69
FIGURA 2A	Alinhamento da seqüência de aminoácidos do gene da capa protéica do isolado IDA.R com isolados disponíveis no banco de genes.....	84

**TABELA 01.** Porcentagem de identidade de nucleotídeo da região da capa protéica do isolado IDA.R entre diferentes isolados de PVS, obtidos por meio do alinhamento múltiplo utilizando CLUSTAL W. UFLA, Lavras-MG, 2005.

<b>Isolados</b>	<b>01</b>	<b>02</b>	<b>03</b>	<b>04</b>	<b>05</b>	<b>06</b>	<b>07</b>	<b>08</b>	<b>09</b>	<b>10</b>	<b>11</b>	<b>12</b>	<b>13</b>	<b>14</b>	<b>15</b>	<b>16</b>	<b>17</b>	<b>18</b>	<b>19</b>
<b>1.IDA.R</b>	--	93	93	94	94	94	94	94	93	94	94	94	80	94	80	95	93	92	93
<b>2.15613</b>		--	100	98	97	97	96	97	99	96	96	98	82	98	81	94	94	94	95
<b>3.Y15612</b>			--	98	97	97	96	97	99	96	96	98	82	98	81	94	94	94	95
<b>4. Y15611</b>				--	98	98	96	98	97	97	97	98	82	98	81	94	94	94	95
<b>5.Y15610</b>					--	99	96	99	97	97	96	98	82	98	81	95	94	95	95
<b>6.Y15609</b>						--	96	99	97	96	96	98	82	98	81	94	94	95	95
<b>7.Y15625</b>							--	96	95	97	95	96	82	96	96	94	93	95	95
<b>8.Y15616</b>								--	97	97	96	98	82	98	81	95	94	95	95
<b>9.Y15615</b>									--	96	96	97	81	97	81	94	93	94	94
<b>10.Y15614</b>										--	95	97	81	97	81	94	93	94	94
<b>11.AY687337</b>											--	97	81	98	81	93	93	93	94
<b>12.AY512653</b>												--	81	98	98	81	94	94	95
<b>13.AF493951</b>													--	81	85	81	81	81	81
<b>14.AF493950</b>														--	81	94	94	94	95
<b>15.D00461</b>															--	81	80	81	81
<b>16.AY79209</b>																--	93	93	94
<b>17.Y45593</b>																	--	93	94
<b>18.U74376</b>																		--	95
<b>19.U74375</b>																			--



Denominação e caracterização de isolados de PVS, obtidos no banco de genes, na região referente a capa proteica. Lavras – MG, 2005.

Gênero	Espécie	Acesso	Public./Origem
<i>Carlavirus</i>	<i>Potato virus S(PVS)</i>	AF 493950	Boonham et al.,2003 Inglaterra
<i>Carlavirus</i>	<i>Potato virus S(PVS)</i>	AF 493951	Boonham et al.,2003/Inglaterra
<i>Carlavirus</i>	<i>Potato virus S(PVS)</i>	Y 15609.	Matousek et al. 2000/Rep.Tcheca
<i>Carlavirus</i>	<i>Potato virus S(PVS)</i>	Y 15610	Matousek et al. 2000/ Rep Tcheca
<i>Carlavirus</i>	<i>Potato virus S(PVS)</i>	Y 15611	Matousek et al. 2000/ Rep Tcheca
<i>Carlavirus</i>	<i>Potato virus S(PVS)</i>	Y 15612	Matousek et al. 2000/Rep Tcheca
<i>Carlavirus</i>	<i>Potato virus S(PVS)</i>	Y15613	Matousek et al. 2000/Rep Tcheca
<i>Carlavirus</i>	<i>Potato virus S(PVS)</i>	Y 15614	Matousek et al. 2000/ Rep Tcheca
<i>Carlavirus</i>	<i>Potato virus S(PVS)</i>	Y 15615	Matousek et al. 2000/ Rep Tcheca
<i>Carlavirus</i>	<i>Potato virus S(PVS)</i>	Y 15616	Matousek et al. 2000/ Rep Tcheca
<i>Carlavirus</i>	<i>Potato virus S(PVS)</i>	Y 15625	Matousek et al. 2000/ Rep Tcheca
<i>Carlavirus</i>	<i>Potato virus S(PVS)</i>	AY 079209	Não publicado/ China
<i>Carlavirus</i>	<i>Potato virus S(PVS)</i>	AY 512653	Não publicado/ China
<i>Carlavirus</i>	<i>Potato virus S(PVS)</i>	AY 687337	Não publicado/ China
<i>Carlavirus</i>	<i>Potato virus S(PVS)</i>	D.00461	MacKenzie et al., 1989 / Canadá
<i>Carlavirus</i>	<i>Potato virus S(PVS)</i>	S 45593	Foster & Mills,1992/ Inglaterra
<i>Carlavirus</i>	<i>Potato virus S(PVS)</i>	U 74376	Não publicado/Coréia do sul
<i>Carlavirus</i>	<i>Potato virus S(PVS)</i>	U74375	Não publicado/Coréia do sul









FIGURA 1A. "CONT."

IDA . R	181	240
AY079209	CACAATTCAACATTGAGCAACATCTCTTTTGTAGATAGTGGCCCTCGCTTTGAGCCAACC	
AY687337	CACAATTCAACATTGAGCAACATCTCTTTTGTAGATAGTGGCCCTCGCTCGAGCCGACC	
AF493950	CACAATTCAACATTGAGCAACATCTCTTTTGTAGATAGTGGCCCTCACTTGTAGCCGACT	
AY512653	CACAATTCAACATTGAGCAACATCTCTTTTGTAGATAGTGGCCCTCACTTGTAGCCGACC	
Y15613	CACAATCCAACATTGAGCAACATCTCTTTTGTAGATAGTGGCCCTCACTTGTAGCCGACC	
Y15612	CACAATTCAACATTGAGCAACATCTCTTTTGTAGATAGTGGCCCTCACTTGTAGCCGACC	
Y15615	CACAATTCAACATTGAGCAACATCTCTTTTGTAGATAGTGGCCCTCACTTGTAGCCGACC	
Y15611	CACAATTCAACATTGAGCAACATCTCTTTTGTAGATAGTGGCCCTCACTTGTAGCCGACC	
Y15609	CACAATTCAACATTGAGCAACATCTCTTTTGTAGATAGTGGCCCTCACTTGTAGCCGACC	
Y15616	CACAATTCAACATTGAGCAACATCTCTTTTGTAGATAGTGGCCCTCACTTGTAGCCGACC	
Y15610	CACAATTCAACATTGAGCAACATCTCTTTTGTAGATAGTGGCCCTCACTTGTAGCCGACC	
Y15625	CACAATTCAACATTGAGCAACATCTCTTTTGTAGATAGTGGCCCTCGCTTGTAGCCGACC	
Y15614	CACAATTCAACATTGAGCAACATCTCTTTTGTAGATAGTGGCCCTCGCTTGTAGCCGACC	
U74376	CACAATTCAACATTGAGCAACATCTCTTTTGTAGATAGTGGCCCTCACTTGTAGCCGACC	
U74375	CACAATTCAACATTGAGCAACATCTCTTTTGTAGATAGTGGCCCTCACTTGTAGCCGACC	
Y45593	CACAATTCAACATTGAGCAACATAGCTTTTGTAGATAGTGGCCCTCACTTGTAGCCGACC	
AF493951	CATAACTCAACGTTGAGCAACATCTCTTTTGTAGATAGTGGCCCGCTTGTAGCCCTACC	
D00461	CACAACCTCGACATTGAGCAACATCTCTTTTGTAAATAGTGGCCCGCTGTAGAACCCGACC	
	** ** * ** ***** * * ** *	
		"...Continua..."



FIGURA 1A. "CONT."

301  
IDA. R  
AY079209 AAGATGGAAATCCGATCTGTGTCCAAACAACATGGCGAACACCCGAGCAAATGGCACAAATC 360  
AY687337 AAGATGGAAATCCGATCTGTGTCCAAACAACATGGCGAACACCCGAGCAAATGGCTCAAATC  
AF493950 AAGATGGAAATCCGATCTGTGTCCAAACAACATGGCGAACACCCGAGCAAATGGCACAGATC  
AY512653 AAGATGGAAATCCGATCTGTGTCCAAACAACATGGCGAACACCCGAGCAAATGGCACAAATC  
Y15613 AAGATGGAAATCCGATCTGTGTCCAAACAACATGGCGAACACCCGAGCAAATGGCACAAATC  
Y15612 AAGATGGAAATCCGATCTGTGTCCAAACAACATGGCGAACACCCGAGCAAATGGCACAAATC  
Y15615 AAGATGGAAATCCGATCTGTGTCCAAACAACATGGCGAACACCCGAGCAAATGGCACAAATC  
Y15611 AAGATGGAAATCCGATCTGTGTCCAAACAACATGGCGAACACCCGAGCAAATGGCACAGATC  
Y15609 AAGATGGAAATCCGATCTGTGTCCAAACAACATGGCGAACACCCGAGCAAATGGCACAAATC  
Y15616 AAGATGGAAATCCGATCTGTGTCCAAACAACATGGCGAACACCCGAGCAAATGGCACAAATC  
Y15610 AAGATGGAAATCCGATCTGTGTCCAAACAACATGGCGAACACCCGAGCAAATGGCACAAATC  
Y15625 AAGATGGAAATCCGATCTGTGTCCAAACAACATGGCGAACACCCGAGCAAATGGCGCAAATC  
Y15614 AAGATGGAAATCCGATCTGTGTCCAAACAACATGGCGAACACCCGAGCAAATGGCACAAATC  
U74376 AAGATGGAAATCCGATCTGTGTCCAAACAACATGGCGAACACCCGAGCAAATGGCGCAAATC  
U74375 AAGATGGAAATCCGATCTGTGTCCAAACAACATGGCGAACACCTGAGCAAATGGCGCAAATC  
Y45593 AAGATGGAAATCCGATCTGTGTCCAAACAACATGGCGAAATCTGAGCAAATGGCACAAATC  
AF493951 AAGATGGAAATCCGATCTGTGTCCAAACAACATGGCGAAATCTGAGCAAATGGCACAGATC  
D00461 AAGATGGAAATCCGATCTGTGTCCAAACAACATGGCGAAATCTGAGCAAATGGCACAGATC  
\*\* \*\*\*\*\* \*\* \*\* \*\* \*\*\*\*\* \*\* \*\* \*\* \*\*\*\*\* \*\* \*\* \*\* \*\*\*\*\* \*\* \*\* \*\*  
"...Continua..."

FIGURA 1A. "CONT."

IDA. R	420
AY079209	ACTGCTGACATCGCTGGACTCGGGGTCCCCACTGAAACACGTTGCAGGGGTGCTACTACTGAAG
AY687337	ACTGCTGACATCGCTGGACTCGGGGTCCCCACAGAACACGTTGCAGGGGTGCTACTACTGAAA
AF493950	ACTGCCGACATCGCTGGACTTTGGGGTCCCCACTGAAACACGTTGCAGGGGTGCTACTACTGAAG
AY512653	ACTGCTGACATCGCTGGACTTTGGGGTCCCCACTGAAACACGTTGCAGGGGTGCTACTACTGAAA
Y15613	ACTGCTGACATCGCTGGACTTTGGGGTCCCCACTGAGCACGTTGCAGGGGTGCTACTACTGAAA
Y15612	ACTGCTGACATCGCTGGACTTTGGGGTCCCCACTGAGCACGTTGCAGGGGTGCTACTACTGAAA
Y15615	ACTGCTGACATCGCTGGACTTTGGGGTCCCCACTGAGCACGTTGCAGGGGTGCTACTACTGAAA
Y15611	ACTACTGACATCGCTGGACTTTGGGGTCCCCACTGAAACACGTTGCAGGGGTGCTACTACTGAAA
Y15609	ACTGCTGACATCGCTGGACTTTGGGGTCCCCACTGAAACACGTTGCAGGGGTGCTACTACTGAAA
Y15616	ACTGCTGACATCGCTGGACTTTGGGGTCCCCACTGAAACACGTTGCAGGGGTGCTACTACTGAAA
Y15610	ACTGCTGACATCGCTGGACTTTGGGGTCCCCACTGAAACACGTTGCAGGGGTGCTACTACTGAAA
Y15625	ACTGCTGACATCGCTGGACTTTGGGGTCCCCACTGAAACACGTTGCAGGGGTGCTACTACTGAAA
Y15614	ACTGCTGACATCGCTGGACTTTGGGGTCCCCACTGAAACACGTTGCAGGGGTGCTACTACTGAAA
U74376	ACTGCTGACATCGCTGGACTTTGGGGTCCCCACTGAAACACGTTGCAGGGGTGCTACTACTGAAA
U74375	ACTGCTGACATCGCTGGACTTTGGGGTCCCCACTGAAACACGTTGCAGGGGTGCTACTACTGAAA
Y45593	ACTGCTGACATCGCTGGACTTTGGGGTCCCCACTGAAACACGTTGCAGGGGTGCTACTACTGAAA
AF493951	ACCGGGATATCGCTGGGTGTTCCCACTGAGCATGTTGCAGGGGTGCTACTACTGAAG
D00461	ACCGGGATATTCAGGGCTCGGCGTCCCCACAGAGCATGTGGCGGGGTGCTACTACTGAAG

\*\* \* \*\* \*\* \*\* \* \* \* \* \*  
\*\* \*\* \*\* \*\* \*\* \* \* \* \* \*  
\*\* \*\* \*\* \*\* \* \* \* \* \*  
\*\* \*\* \*\* \* \* \* \* \*  
\* \* \* \* \*

“...Continua...”

FIGURA IA. "CONT."

	480
IDA. R	GTGGTGATCATGTGTGCAAGCGTGAGTAGCTCTGTTTATCTGGATCCGGCAGGGACTGTG
AY079209	GTGGTAATCATGTGTGCAAGCGTGAGTAGCTCTGTTTATCTAGACCCGGCAGGGACTGTT
AY687337	GTGGTGATCATGTGTGCAAGCGTGAGTAGCTCTGTTTATCTAGATCCAGCAGGGACTGTG
AF493950	GTGGTGATCATGTGTGCAAGCGTGAGTAGCTCTGTTTATCTAGATCCAGCAGGGACTGTG
AY512653	GTGGTGATCATGTGTGCAAGCGTGAGTAGCTCTGTTTATCTAGATCCAGCAGGGACTGTG
Y15613	GTGGTGATCATGTGTGCAAGCGTGAGTAGCTCTGTTTATCTAGATCCAGCAGGGACTGTG
Y15612	GTGGTGATCATGTGTGCAAGCGTGAGTAGCTCTGTTTATCTAGATCCAGCAGGGACTGTG
Y15615	GTGGTGATCATGTGTGCAAGCGTGAGTAGCTCTGTTTATCTAGATCCAGCAGGGACTGTG
Y15611	GTGGTGATCATGTGTGCAAGCGTGAGTAGCTCTGTTTATCTAGATCCAGCAGGGACTGTG
Y15609	GTGGTGATCATGTGTGCAAGCGTGAGTAGCTCTGTTTATCTAGATCCAGCAGGGACTGTG
Y15616	GTGGTGATCATGTGTGCAAGCGTGAGTAGCTCTGTTTATCTAGATCCAGCAGGGACTGTG
Y15610	GTGGTGATCATGTGTGCAAGCGTGAGTAGCTCTGTTTATCTAGATCCAGCAGGGACTGTG
Y15625	GTGGTGATCATGTGTGCAAGCGTGAGTAGCTCTGTTTATCTAGATCCAGCAGGGACTGTG
Y15614	GTGGTGATCATGTGTGCAAGCGTGAGTAGCTCTGTTTATCTAGATCCAGCAGGGACTGTG
U74376	GTGGTGATCATGTGTGCAAGCGTGAGTAGCTCTGTTTATCTAGATCCAGCAGGGACTGTG
U74375	GTGGTGATCATGTGTGCAAGCGTGAGTAGCTCTGTTTATCTAGATCCAGCAGGGACTGTG
Y45593	GTGGTGATCATGTGTGCAAGCGTGAGTAGCTCTGTTTATCTAGATCCAGCAGGGACTGTG
AF493951	GTGGTGATCATGTGTGCAAGCGTGAGTAGCTCTGTTTATCTAGATCCAGCAGGGACTGTG
D00461	GTCCGTAATTAATGTGGCAAGCGTGAGTAGCTCTGTTTACTTACCTAGACCCCTGCAGGGACTGTT
	** ** * * * * * ** * * * * * ** * * * * * ** * * * * * ** * * * * *
	"...Continua..."





FIGURA 1A. "CONT."

```

541          IDA.R              600
AY079209    GGATTGAGAAAAGTGTGCAGGCTGTACGCTCCAGTCCGTCGTTGGAAATFACATGCTAGTCCAG
AY687337    GGATTGAGAAAAGTGTGCAGGCTGTACGCTCCAGTCCGTCGTTGGAAATFACATGCTAGTCCAG
AF493950    GGACTGAGAAAAGTGTGCAGGCTGTATGCTCCAGTCCGTCGTTGGAAATFACATGCTAGTCCAG
AY512653    GGATTGAGAAAAGTGTGCAGGCTGTATGCTCCAGTCCGTCGTTGGAAATFACATGCTAGTCCAG
Y15613      GGATTGAGAAAAGTGTGCAGGCTGTATGCTCCAGTCCGTCGTTGGAAATFACATGCTAGTCCAA
Y15612      GGATTGAGAAAAGTGTGCAGGCTGTATGCTCCAGTCCGTCGTTGGAAATFACATGCTAGTCCAA
Y15615      GGATTGAGAAAAGTGTGCAGGCTGTATGCTCCAGTCCGTCGTTGGAAATFACATGCTAGTCCAA
Y15611      GGGTTGAGAAAAGTGTGCAGGCTGTATGCTCCAGTCCGTCGTTGGAAATFACATGCTAGTCCAG
Y15609      GGGTTGAGAAAAGTGTGCAGGCTGTATGCTCCAGTCCGTCGTTGGAAATFACATGCTAGTCCAG
Y15616      GGGTTGAGAAAAGTGTGCAGGCTGTATGCTCCAGTCCGTCGTTGGAAATFACATGCTAGTCCAG
Y15610      GGGTTGAGAAAAGTGTGCAGGCTGTATGCTCCAGTCCGTCGTTGGAAATFACATGCTAGTCCAG
Y15625      GGGTTGAGAAAAGTGTGCAGGCTGTATGCTCCAGTCCGTCGTTGGAAATFACATGCTAGTCCAG
Y15614      GGGTTGAGAAAAGTGTGCAGGCTGTATGCTCCAGTCCGTCGTTGGAAATFACATGCTAGTCCAG
U74376      GGGTTGAGAAAAGTGTGCAGGCTGTATGCTCCAGTCCGTCGTTGGAAATFACATGCTAGTCCAG
U74375      GGGTTGAGAAAAGTGTGCAGGCTGTATGCTCCAGTCCGTCGTTGGAAATFACATGCTAGTCCAA
Y45593      GGCTTGAGAAAAGTGTGCAGGCTGTATGCTCCAGTCCGTCGTTGGAAATFACATGCTAGTCCAA
AF493951    GGGTTGAGAAAAGTGTGCAGGCTGTATGCTCCAGTCCGTCGTTGGAAATFACATGCTAGTCCAG
D00461      GGGTTGAGAAAAGTGTGCAGGCTGTATGCTCCAGTCCGTCGTTGGAAATFACATGCTAGTCCAG
**         **         **         **         **         **         **         **
          ...Continua...

```

FIGURA 1A. "CONT."

	660
IDA. R	AATAGGCCACCTTCGGATTGGCAGGCCGATGGGATTTCAATGGAAACGCACGCTTTCGCCGCA
AY079209	AATAGGCCACCTTCAGATTGGCAGGCCATGGGATTTCAATGGAAATGCACGCTTTCGCCGC-
AY687337	AATAGGCCACCTTCGGATTGGCAGGCCATGGGATTTCAATGGAAACGCACGCTTTCGCCGCA
AF493950	AATAGGCCACCTTCGGATTGGCAGGCCATGGGATTTCAATGGAAACGCACGCTTTCGCCGCA
AY512653	AATAGGCCACCTTCGGATTGGCAGGCCATGGGATTTCAATGGAAACGCACGCTTTCGCCGCA
Y15613	AATAGGCCACCTTCAGATTGGCAGGCCATGGGATTTCAATGGAAACGCACGCTTTCGCCGCA
Y15612	AATAGGCCACCTTCAGATTGGCAGGCCATGGGATTTCAATGGAAACGCACGCTTTCGCCGCA
Y15615	AATAGGCCACCTTCAGATTGGCAGGCCATGGGATTTCAATGGAAACGCACGCTTTCGCCGCA
Y15611	AATAGGCCACCTTCAGATTGGCAGGCCATGGGATTTCAATGGAAACGCACGCTTTCGCCGCA
Y15609	AATAGGCCACCTTCAGATTGGCAGGCCATGGGATTTCAATGGAAACGCACGCTTTCGCCGCA
Y15616	AATAGGCCACCTTCGGATTGGCAGGCCATGGGATTTCAATGGAAACGCACGCTTTCGCCGCA
Y15610	AATAGGCCACCTTCGGATTGGCAGGCCATGGGATTTCAATGGAAACGCACGCTTTCGCCGCA
Y15625	AATAGGCCACCTTCGGATTGGCAGGCCATGGGATTTCAATGGAAACGCACGCTTTCGCCGCA
Y15614	AATAGGCCACCTTCGGATTGGCAGGCCATGGGATTTCAATGGAAACGCACGCTTTCGCCGCA
U74376	ACAANAACCACTTCGGATTGGCAGGCCATGGGATTTCAATGGAAATGCACGCTTTCGCCGCA
U74375	AATAGGCCACCTTCGGATTGGCAGGCCATGGGATTTCAATGGAAATGCACGCTTTCGCCGCA
Y45593	AATAGGCCACCTTCGGATTGGCAGGCCATGGGATTTCAATGGAAATGCACGCTTTCGCCGCA
AF493951	AACAGGCCCCGTCAGACTGGCAAGCCATGGGGTTCAATGGAAATGCACGCTTTCGCCGCT
D00461	AATAGGCCACCTTCAGATTGGCAGGCCATGGGGTTCAATGGAAATGCACGCTTTCGCCGCT
	* * * * *

"...Continua..."

FIGURA 1A. "CONT."

	661	720
IDA. R	TTTGACACATTCGATTATGTGACTAATGGGGCTGCAGTCCAGCCCGTAGAGGGGTCATA	
AY079209	-----	-----
AY687337	TTTGACACATTCGATTATGTGACTAATGGGGCTGCAGTCCAACCCGTAGAGGGGCTCATA	
AF493950	TTTGATACATTCGATTATGTGACTAATGGGGCTGCAGTCCAACCCGTAGAGGGGCTCATA	
AY512653	TTTGACACATTCGATTATGTGACTAATGGGGCTGCAGTCCAACCCGTAGAGGGGCTCATA	
Y15613	TTTGACACATTCGATTATGTGACTAATGGGGCTGCAGTCCAACCCGTAGAGGGGCTCATA	
Y15612	TTTGACACATTCGATTATGTGACTAATGGGGCTGCAGTCCAACCCGTAGAGGGGCTCATA	
Y15615	TTTGACACATTCGATTATGTGACTAATGGGGCTGCAGTCCAACCCGTAGAGGGGCTCATA	
Y15611	TTTGACACATTCGATTATGTGACTAATGGGGCAGCAGTCCAACCCGTAGAGGGGCTCATA	
Y15609	TTTGACACATTCGATTATGTGACTAACGGGGCTGCAGTCCAACCCGTAGAGGGGCTCATA	
Y15616	--TGACACATTCGATTATGTGACTAACGGGGCTGCAGTCCAACCCGTAGAGGGGCTCATA	
Y15610	TTTGACACATTCGATTATGTGACTAACGGGGCTGCAGTCCAACCCGTAGAGGGGCTCATA	
Y15625	TTTGACACATTCGATTATGTGACTAATGGGGCTGCAATCCAGCCCGTAGAGGGGCTCATA	
Y15614	-----CCAGCCCGTAGAGGGGCTCATA	
U74376	TTTGACACATTCGATTATGTGACTAATGGGGCTGCAGTCCAGCCCATAGAGGGGCTCATA	
U74375	TTTGACACATTCGATTATGTGACTAATGGGGCTGCAATCCAGCCCGTAGAGGGGCTCATA	
Y45593	TTTGACACATTTGATTATGTGACCAATGGGGCTGCAGTCCAGCCCGTAGAGGGGCTCATA	
AF493951	TTTGACACTTTTACTATGTGACTAACGGTGCTGCAATCCAGCCCGTAGAGGGGCTCATT	
D00461	TTTGACACATTTGATTATGTGACTAACGGCGCTGCAATCCAGCCTGTTGAGGGGCTCATC	

"...Continua..."

FIGURA 1A. "CONT."

	721		780
IDA.R		CGCAGGCCACGGCCTGAGGAAAACAATAGCTCACAATGCCCTCAA	-----GAGTATG
AY079209		-----	-----
AY687337		CGCAGACCCACACCTGAGGAAAACAATAGCTCACAATGCCCAAA	-----GAGTATG
AF493950		CGCAGACCCACACCTGAGGAAAACAATAGCTCACAATGCCCAAA	-----GAGTATG
AY512653		CGCAGACCCACACCTGAGGAAAACAATAGCTCACAATGCCCAAA	-----GAGCATG
Y15613		CGCAGACCCACACCTGAGGAGACAATAGCTCACAATGCCCAAA	-----GAGTATG
Y15612		CGCAGACCCACACCTGAGGAGACAATAGCTCACAATGCCCAAA	-----GAGTATG
Y15615		CGCAGACCCACACCTGAGGAGACAATAGCTCACAATGCCCAAA	-----GAGTATG
Y15611		CGTAGACCCACACCTGAGGAAAACAATAGCTCACAATGCCCAAA	-----GAGTATG
Y15609		CGCAGGCCACACCTGAGGAAAACAATAGCTCACAATGCCCAAA	-----GAGTATG
Y15616		CGCAGGCCACACCTGAGGAAAACAATAGCTCACAATGCCCAAA	-----GAGTATG
Y15610		CGCAGGCCACACCTGAGGAAAACAATAGCTCACAATGCCCAAA	-----GAGTATG
Y15625		CGCAGGCCACACCTGAGGAAAACAATAGCTCACAATGCCCAAA	-----GAGCATG
Y15614		CGCAGACCCACACCTGAGGAAAACAATAGCTCACAATGCCCAAA	-----GAGTATG
U74376		CGCAGGCCACCGCCTGAGGAAAACAATAGCTCACAATGCCCAAA	-----GAGCATG
U74375		CGTAGGCCACCGCAGAGAAAACAATAGCTCACAATGCCCAAA	-----GAGTATG
Y45593		CGCAGGCCACACCTGAGGAAAACAATAGCTCACAATGCCCAAA	-----GAGTATG
AF493951		CGTAGGCCAACTCCTGAGGAGACGATAGCTCATAATGGCACAA	-----GAGCATG
D00461		CGTAGGCCGACGCCCTGAAGAGACAATAGCTCATAACGGTCACAA	-----GAGCATG

"...Continua..."

FIGURA IA. "CONT."

781

840

IDA. R  
 AY079209 GCAATTGCCAAGTGTAAACAGAAATGAGCGGATTGGCCAAACACTAAATGTTGAGTACTCTGGA  
 -----  
 AY687337 GCAATTGACAAGTCGAAACAGAAATGAGCGGATTGGCCAAACACTAAATGTTGAGTACACTGGA  
 AF493950 GCAATTGACAAAATCGAAACAGAAATGAGCGGATTGGCCAAACACTAAATGTTGAGTACACTGGA  
 AY512653 GCAATTGACAAGTCGAAACGGAATGAGCGGATTGGCCAAACACTAAATGTTGAGTACACTGGA  
 Y15613 GCAATTGACAAGTCGAAACAGAAATGAGCGGATTGGCCAAACACTAAATGTTGAGTACACTGGA  
 Y15612 GCAATTGACAAGTCGAAACAGAAATGAGCGGATTGGCCAAACACTAAATGTTGAGTACACTGGA  
 Y15615 GCAATTGACAAGTCGAAACAGAAATGAGCGGATTGGCCAAACACTAAATGTTGAGTACACTGGA  
 Y15611 GCAATTGACAAGTCGAAACAGAAATGAGCGGATTGGCCAAACACTAAATGTTGAGTACACTGGA  
 Y15609 GCAATTGACAAGTCGAAACAGAAATGAGCGGATTGGCCAAACACTAAATGTTGAGTACACTGGA  
 Y15616 GCAATTGACAAGTCGAAACAGAAATGAGCGGATTGGCCAAACACTAAATGTTGAGTACACTGGA  
 Y15610 GCAATTGACAAGTCGAAACAGAAATGAGCGGATTGGCCAAACACTAAATGTTGAGTACACTGGA  
 Y15625 GCAATTGATAAGTCGAAACAGAAATGAGCGGATTAGCCAAACACTAAATGTTGAGTACACTGGA  
 Y15614 GCAATTGACAAGTCGAAACAGAAATGAGCGGATTGGCCAAACACTAAATGTTGAGTACACTGGA  
 U74376 GCAATTGACAAGTCGAAACAGAAATGAGCGGATTGGCCAAACACTAAATGTTGAGTACACTGGA  
 U74375 GCGATTGACAAGTCGAAACAGAAATGAGCGGATTGGCCAAACACTAAATGTTGAGTACACTGGA  
 Y45593 GCAATTGACAAGTCGAAACAGAAATGAGCGGATTGGCCAAACACTAAATGTTGAGTACACTGGA  
 AF493951 GCGCTCGATAAGTCAAAACAGAAATGAAAGGCTGGCCAAACACTAAATGTTGAGTACACTGGG  
 D00461 GCTATTGATAAGTCGAAACAGAAATGAAAGGTTGGCTAACACCAACGTTGAGTATACTGGG

"...Continua..."

FIGURA 1A. "CONT."

85

	841	900
IDA . R	GGGATGCTTGGCGATGAGATTGTGCGCAATCACCGTAACGCGATCAACCAATGA	
AY079209	-----	
AY687337	GGGATGCTTGGCGCTGAGATTGTGCGCAATCACCGCAACGCGATCAACCAATGA	
AF493950	GGGATGCTTGGCGCTGAGATTGTGCGCAATCACCGCAATGCGATCAACCAATGA	
AY512653	GGGATGCTTGGCGCTGAGATTGTGCGCAATCACCGCAATGCGATCAACCAATGA	
Y15613	GGGATGCTTGGCGCTGAGATTGTGCGCAATCACCGTAATGCGATCAACCAATGA	
Y15612	GGGATGCTTGGCGCTGAGATTGTGCGCAATCACCGTAATGCGATCAACCAATGA	
Y15615	GGGATGCTTGGCGCTGAGATTGTGCGCAATCACCGTAACGCGATCAACCAATGA	
Y15611	GGGATGCTTGGCGCTGAGATTGTGCGCAATCACCGCAATGCGATCAACCAATGA	
Y15609	GGGATGCTTGGCGCTGAGATTGTGCGCAATCACCGCAATGCGATCAACCAATGA	
Y15616	GGGATGCTTGGCGCTGAGATTGTGCGCAATCACCGCAATGCGATCAACCAATGA	
Y15610	GGGATGCTTGGCGCTGAGATTGTGCGCAATCACCGCAATGCGATCAACCAATGA	
Y15625	GGGATGCTTGGCGCTGAGATTGTGCGCAATCACCGTAATGCGATCAACCAATGA	
Y15614	GGGATGCTTGGCGCTGAGATTGTGCGCAATCACCGTAATGCGATCAACCAATGA	
U74376	GGAATGCTTGGCGCTGAGATTGTGCGCAATCATCGTAATGCGATCAACCAATGA	
U74375	GGGATGCTTGGCGCTGAGATTGTGCGCAATCACCGTAATGCGATCAACCAATGA	
Y45593	GGGATGCTTGGCGCTGAGATTGTGCGCAATCACCGTAATGCGATCAACCAATGA	
AF493951	GGCATGCTTGGCGCTGAGATTGTGCGCAACCATCGGAATGCAATAAACCAATGA	
D00461	GGCATGCTCGGTGCTGAGATTGTGCGTAATCATCGGAATGCAATAAACCAATGA	

"...Continua..."

	1	60
Y15625	MPPKPDPTSSGEAPQAMPLVPPPRNVEEHRVGPSQGHGQNEEAMLEQRLIRLIELMASKR	
Y15614	MPPKPDPTSSGEAPQAMPLVPPPRNVEEHRVGPSQGHGQNEEAMLEQRLIRLIELMASKR	
Y15611	MPPKPDPTSSGETPQALPLVPPPRNVEEHRVGPSQGHGQNEEAMLEQRLIRLIELMASKR	
Y15610	MPPKPDPTSSGETPQALPLVPPPRNVEEHRVGPSQGHGQNEEAMLEQRLIRLIELMASKR	
Y15609	MPPKPDPTSSGETPQALPPVPPPRNVEEHRVGPSQGHGQNEEAMLEQRLIRLIELMASKR	
Y15616	MPPKPDPTSSGETPQALPPVPPPRNVEEHRVGPSQGHGQNEEAMLEQRLIRLIELMASKR	
AY512653	MPPKPDPTSSGETPQALPPVPPPRNVEEHRVGPSQGHGQNEEAMLEQRLIRLIELMASKR	
Y15613	MPPKPDPTSSGETPQAPPLVPPPRNVEEHRVGPSQEHGQNEEAMLEQRLIRLIELMASKR	
Y15612	MPPKPDPTSSGETPQAPPLVPPPRNVEEHRVGPSQEHGQNEEAMLEQRLIRLIELMASKR	
Y15615	MPPKPDPTSSGETPQAPPLVPPPRNVEEHRVGPSQEHGQNEEAMLEQRLIRLIELMASKR	
AY687337	MPPKPDPTSSGEVPPQAPPLVPPPRNVEEHRVGNQGGQNEEAMLEQRLIRLIELMASKR	
AF493950	MPPKPDPTSSGETPQAPPLVPPPRNVEEHRVGNQGHGQNEEAMLEQRLIRLIELMASKR	
IDA.R	MPPKPDPTSSGETPQAPPLVPPPRNVEEHRVGNQGHGQNEEAMLEQRLIRLIELMASKR	
AY079209	MPPKPDPTSSGETPQAIPLAPPPRNVEEHRVGNQGHGQNEEAMLEQRLIRLIELMASKR	
S45593	MPPKPDPTSSGETPQAIPLAPPPRNVEEHRVGNQGHGQNEEAMLEQRLIRLIELMASKR	
U74376	MPPKPDPTSSGETPQTMPLVPPPRNVEEHRVGSSQGHQSEAMLEQRLIRLIELMASKR	
U74375	MPPKPDPTSSGETPQTVPLVPPPRNVEEHRVGNQGHGQNEEAMLEQRLIRLIELMASKR	
AF493951	MPPKPDPTSSGEAPQAMPYAPPRAAEHKGAPSLGPGPNNEEAMLEQRLVRLIELMAAKR	
D00461	MPPKPDPTSSGEAPQAMPYAPPRAAEHKGAPSLGPGPNNEEAMLEQRLVRLIELMAAKR	
	*****:****.**: .**** . .*****:*****: **	
		“...Continua...”

**FIGURA 2A.** Alinhamento da seqüência de aminoácidos do gene da capa protéica do isolado IDA.R com isolados disponíveis no banco de genes. Lavras-MG, 2005.

FIGURA 2A. "CONT."

61

120

Y15625 HNSTLSNISFEIGRPSLEPTPEMRRNPENPNSRFSIDELFKMEIRSVSNNMANTEQMAQI  
Y15614 HNSTLSNISFEIGRPSLEPTPEMRRNPENPNSRFSIDELFKMEIRSVSNNMANTEQMAQI  
Y15611 HNSTLSNISFEIGRPSLEPTPEMRRNPENPYSRFSIDELFKMEIRSVSNNMANTEQMAQI  
Y15610 HNSTLSNISFEIGRPSLEPTPEMRRNPENPYSRFSIDELFKMEIRSVSNNMANTEQMAQI  
Y15609 HNSTLSNISFEIGRPSLEPTPEMRRNPENPYSRFSIDELFKMEIRSVSNNMANTEQMAQI  
Y15616 HNSTLSNISFEIGRPSLEPTPEMRRNPENPYSRFSIDELFKMEIRSVSNNMANTEQMAQI  
AY512653 HNPTLSNISFEIGRPSLEPTPEMRRNPENPYSRFSIDELFKMEIRSVSNNMANTEQMAQI  
Y15613 HNSTLSNISFEIGRPSLEPTPEMRRNPENPYSRFSIDELFKMEIRSVSNNMANTEQMAQI  
Y15612 HNSTLSNISFEIGRPSLEPTPEMRRNPENPYSRFSIDELFKMEIRSVSNNMANTEQMAQI  
Y15615 HNSTLSNISFEIGRPSLEPTPEMRRNPENPYSRFSIDELFKMEIRSVSNNMANTEQMAQI  
AY687337 HNSTLSNISFEIGRPSLEPTPEMRRNPENPYSRFSIDELFKMEIRSVSNNMANTEQMAQI  
AF493950 HNSTLSNISFEIGRPSLEPTPEMRRNPENPYSRFSIDELFKMEIRSVSNNMANTEQMAQI  
IDA.R HNSTLSNISFEIGRPSLEPTPEMRRNPENPYSRFSIDELFKMEIRSVSNNMANTEQMAQI  
AY079209 HNSTLSNISFEIGRPSLEPTPEMRRNPENPYSRFSIDELFKMEIRSVSNNMANTEQMAQI  
S45593 HNSTLSNIAFEIGRPSLEPTPEMRRNPENPYSRFSIDELFKMEIRSVSNNMANTEQMAQI  
U74376 HNSTLSNISFEIGRPSLEPTPEMRRNPENPYSRFSIDELFKMEIRSVSNNMANTEQMAQI  
U74375 HNSTLSNISFEIGRPSLEPTPEMRRNPENPYSRFSIDELFKMEIRSVSNNMANTEQMAQI  
AF493951 HNSTLSNISFEIGRPALEPTPEMRRNPENPYSRFSIDELFKMEIRSVSNNMANTEQMAQI  
D00461 HNSTLSNISFEIGRPSLEPTPEMRRNPENPYSRFSIDELFKMEIRSVSNNMANTEQMAQI

\*\* .\*\*\*\*\* :\*\*\*\*\* :\*\*\*\*\* \*\*\*\*\* \*\*\*\*\*

"...Continua..."



FIGURA 2A. "CONT."

181

240

Y15625 TADIAGLGPTEHVAGVILKVVIMCASVSSSVYLDPAQTVEFFPTGAVPLDSIIAIMKNRA  
 Y15614 TADIAGLGPTEHVAGVILKVVIMCASVSSSVYLDPAQTVEFFPTGAVPLDSIIAIMKNRA  
 Y15611 TTDIAGLGPTEHVAGVILKVVIMCASVSSSVYLDPAQTVEFFPTGAVPLDSIIAIMKNRA  
 Y15610 TADIAGLGPTEHVAGVILKVVIMCASVSSSVYLDPAQTVEFFPTGAVPLDSIIAIMKNRA  
 Y15609 TADIAGLGPTEHVAGVILKVVITCASVSSSVYLDPAQTVEFFPTGAVPLDSIIAIMKNRA  
 Y15616 TADIAGLGPTEHVAGVILKVVIMCASVSSSVYLDPAQTVEFFPTGAVPLDSIIAIMKNRA  
 AY512653 TADIAGLGPTEHVAGVILKVVIMCASVSSSVYLDPAQTVEFFPTGAVPLDSIIAIMKNRA  
 Y15613 TADIAGLGPTEHVAGVILKVVIMCASVSSSVYLDPAQTVEFFPTGAVPLDSIIAIMKNRA  
 Y15612 TADIAGLGPTEHVAGVILKVVIMCASVSSSVYLDPAQTVEFFPTGAVPLDSIIAIMKNRA  
 Y15615 TADIAGLGPTEHVAGVILKVVIMCASVSSSVYLDPAQTVEFFPTGAVPLDSIIAIMKNRA  
 AY687337 TADIAGLGPTEHVAGVILKVVIMCASVSSSVYLDPAQTVEFFPTGAVPLDSIIAIMKNRA  
 AF493950 TADIAGLGPTEHVAGVILKVVIMCASVSSSVYLDPAQTVEFFPTGAVPLDSIIAIMKNRA  
 IDA.R TADIAGLGPTEHVAGVILKVVIMCASVSSSVYLDPAQTVEFFPTGAVPLDSIIAIMKNRA  
 AY079209 TADIAGLGPTEHVAGVILKVVIMCASVSSSVYLDPAQTVEFFPTGAVPLDSIIAIMKNRA  
 S45593 TADIAGLGPTEHVAGVILKVVIMCASVSSSVYLDPAQTVEFFPTGAVPLDSIIAIMKNRA  
 U74376 TADIAGLGPTEHVAGVILKVVIMCASVSSSVYLDPAQTVEFFPTGAVPLDSIIAIMKNRA  
 U74375 TADIAGLGPTEHVAGVILKVVIMCASVSSSVYLDPAQTVEFFPTGAVPLDSIIAIMKNRA  
 AF493951 TADIAGLGPTEHVAGVILKVVIMCASVSSSVYLDPAQTVEFFPTGAVPLDSIIAIMKNRA  
 D00461 TADIAGLGPTEHVAGVILKVVIMCASVSSSVYLDPAQTVEFFPTGAVPLDSIIAIMKNRA  
 \*:\*\*\*\*\* \*\*\*\*\* \* \* \* \* \* \*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*

"...Continua..."

FIGURA 2A. "CONT."

300

360

Y15625 GLRKVCRLYAPVWVWNYMLVQNRPPSDWQAMGFQWNNARFAAFDFTFDYVVTNGAAIQPVEGLI  
Y15614 GLRKVCRLYAPVWVWNYMLVQNRPPSDWQAMGFQF - - - - -VEGLI  
Y15611 GLRKVCRLYAPVWVWNYMLVQNRPPSDWQAMGFQWNNARFAAFDFTFDYVVTNGAAVQPVEGLI  
Y15610 GLRKVCRLYAPVWVWNYMLVQNRPPSDWQAMGFQWNNARFAAFDFTFDYVVTNGAAVQPVEGLI  
Y15609 GLRKVCRLYAPVWVWNYMLVQNRPPSDWQAMGFQWNNARFAAFDFTFDYVVTNGAAVQPVEGLI  
Y15616 GLRKVCRLYAPVWVWNYMLVQNRPPSDWQAMGFQWNNAR - - - FDTFDYVVTNGAAVQPVEGLI  
AY512653 GLRKVCRLYAPVWVWNYMLVQNRPPSDWQAMGFQWNNARFAAFDFTFDYVVTNGAAVQPVEGLI  
Y15613 GLRKVCRLYAPVWVWNYMLVQNRPPSDWQAMGFQWNNARFAAFDFTFDYVVTNGAAVQPVEGLI  
Y15612 GLRKVCRLYAPVWVWNYMLVQNRPPSDWQAMGFQWNNARFAAFDFTFDYVVTNGAAVQPVEGLI  
Y15615 GLRKVCRLYAPVWVWNYMLVQNRPPSDWQAMGFQWNNARFAAFDFTFDYVVTNGAAVQPVEGLI  
AY687337 GLRKVCRLYAPVWVWNYMLVQNRPPSDWQAMGFQWNNARFAAFDFTFDYVVTNGAAVQPVEGLI  
AF493950 GLRKVCRLYAPVWVWNYMLVQNRPPSDWQAMGFQWNNARFAAFDFTFDYVVTNGAAVQPVEGLI  
IDA.R GLRKVCRLYAPVWVWNYMLVQNRPPSDWQAMGFQWNNARFAAFDFTFDYVVTNGAAVQPVEGLI  
AY079209 GLRKVCRLYAPVWVWNYMLVQNRPPSDWQAMGFQWNNARFAA - - - - -  
S45593 GLRKVCRLYAPVWVWNYMLVQNRPPSDWQAMGFQWNNARCAAFDFTFDYVVTNGAAVQPVEGLI  
U74376 GLRKVCRLYAPVWVWNYMLVQTKPPSDWQAMGFQWNNARCAAFDFTFDYVVTNGAAVQPIEGLI  
U74375 GLRKVCRLYAPVWVWNYMLVQNRPPSDWQAMGFQWNNARCAAFDFTFDYVVTNGAAIQPVEGLI  
AF493951 GLRKVCRLYAPVWVWNYMLVQNRPPSDWQAMGFQWNNARFAAFDFTFDYVVTNGAAIQPVEGLI  
D00461 GLRKVCRLYAPVWVWNYMLVQNRPPSDWQAMGFQWNNARFAAFDFTFDYVVTNGAAIQPVEGLI  
\*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*

"...Continua..."

FIGURA 2A. "CONT."

361

420

Y15625 RRPTPEEAIAHN---AHKSMAIDKSNRNERLANTNVEYTGGM LGAEIVRNHRNAINQ  
Y15614 RRPTPEETIAHN---AHKSMAIDKSNRNERLANTNVEYTGGM LGAEIVRNHRNAINQ  
Y15611 RRPTPEETIAHN---AHKSMAIDKSNRNERLANTNVEYTGGM LGAEIVRNHRNAINQ  
Y15610 RRPTPEETIAHN---AHKSMAIDKSNRNERLANTNVEYTGGM LGAEIVRNHRNAINQ  
Y15609 RRPTPEETIAHN---AHKSMAIDKSNRNERLANTNVEYTGGM LGAEIVRNHRNAINQ  
Y15616 RRPTPEETIAHN---AHKSMAIDKSNRNERLANTNVEYTGGM LGAEIVRNHRNAINQ  
AY512653 RRPTPEETIAHN---AHKSMAIDKSNRNERLANTNVEYTGGM LGAEIVRNHRNAINQ  
Y15613 RRPTPEETIAHN---AHKSMAIDKSNRNERLANTNVEYTGGM LGAEIVRNHRNAINQ  
Y15612 RRPTPEETIAHN---AHKSMAIDKSNRNERLANTNVEYTGGM LGAEIVRNHRNAINQ  
Y15615 RRPTPEETIAHN---AHKSMAIDKSNRNERLANTNVEYTGGM LGAEIVRNHRNAINQ  
AY687337 RRPTPEETIAHN---AHKSMAIDKSNRNERLANTNVEYTGGM LGAEIVRNHRNAINQ  
AF493950 RRPTPEETIAHN---AHKSMAIDKSNRNERLANTNVEYTGGM LGAEIVRNHRNAINQ  
IDA.R -----  
AY079209 -----  
S45593 RRPTPEETIAHNAHKSMAIDKSNRNERLANTNVEYTGGM LGAEIVRNHRNAINQ  
U74376 RRPTPEETIAHN---AHKSMAIDKSNRNERLANTNVEYTGGM LGAEIVRNHRNAINQ  
U74375 RRPTPEETIAHN---AHKSMAIDKSNRNERLANTNVEYTGGM LGAEIVRNHRNAINQ  
AF493951 RRPTPEETIAHN---AHKSMAIDKSNRNERLANTNVEYTGGM LGAEIVRNHRNAINQ  
D00461 RRPTPEETIAHN---AHKSMAIDKSNRNERLANTNVEYTGGM LGAEIVRNHRNAINQ