



JOÃO RONALDO CLEMENTE FERNANDES

**CLONAGEM DE FRAGMENTOS GENÔMICOS
DE VIRUS QUARENTENÁRIOS PARA O
BRASIL VISANDO UTILIZAÇÃO COMO
CONTROLE POSITIVO EM DIAGNOSE POR
PCR E RT-PCR**

LAVRAS - MG

2012

JOÃO RONALDO CLEMENTE FERNANDES

**CLONAGEM DE FRAGMENTOS GENÔMICOS DE VIRUS
QUARENTENÁRIOS PARA O BRASIL PARA UTILIZAÇÃO COMO
CONTROLE POSITIVO EM DIAGNOSE POR RT-PCR**

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

Orientadora

Dr^a. Antônia dos Reis Figueira

LAVRAS - MG

2012

**Ficha Catalográfica Elaborada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca da UFLA**

Fernandes, João Ronaldo Clemente.

Clonagem de fragmentos genômicos de vírus quarentenários para o Brasil visando utilização como controle positivo em diagnose por PCR e RT-PCR / João Ronaldo Clemente Fernandes. – Lavras : UFLA, 2012.

67 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2012.

Orientador: Antônia dos Reis Figueira.

Bibliografia.

1. RT-PCR/PCR. 2. Detecção. 3. Diagnose. 4. Controle positivo.
I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 576.6483

JOÃO RONALDO CLEMENTE FERNANDES

**CLONAGEM DE FRAGMENTOS GENÔMICOS DE VIRUS
QUARENTENÁRIOS PARA O BRASIL PARA UTILIZAÇÃO COMO
CONTROLE POSITIVO EM DIAGNOSE POR RT-PCR**

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

Aprovada em 12 de setembro de 2012

Dr. Luciano Vilela Paiva

UFLA

Dr. Ricardo Magela de Souza

UFLA

Dr^a. Antônia dos Reis Figueira

Orientadora

LAVRAS – MG

2012

A minha família, por todo carinho e compreensão que tiveram durante este tempo, em especial aos meus pais (in memoriam), Rejane e Ronaldo, meus irmãos, Alessandra, Marcel e Nicolas, minha querida tia Maruza, por entenderem minhas dificuldades.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A professora Dr^a. Antônia, pela orientação, esclarecimentos e por ter permitido que esse mestrado se concretizasse, principalmente por dividir seu conhecimento e experiência durante este caminho.

Ao Laboratório de Virologia Molecular e ao Centro de Indexação de Virus, por disponibilizar a estrutura a qual foi possível realizar este trabalho. E também pela excepcional convivência com todos.

A Universidade Federal de Lavras e ao Programa de Biotecnologia Vegetal, pela oportunidade de realização do curso e a CAPES pela concessão da bolsa.

Ao Laboratório Central de Biologia Molecular pela estrutura disponibilizada, principalmente ao Prof. Luciano Paiva pelo apoio e dedicação. Ao Fabrício, Heliete e demais companheiros do laboratório, pela ajuda e amizade incondicional.

Aos professores do Programa de Biotecnologia Vegetal, por dividir seu conhecimento para a minha formação e dos demais colegas.

Aos funcionários de encontro diário, D. Rosane e Maria de Lourdes.

Aos amigos da Virologia Molecular, Nara, Denise, Maurício, Priscilla, Suellen, Bárbara, Anderson, Douglas, João, Matheus e Silvia, que, acompanharam, aconselharam e corrigiram sempre que foi necessária contribuição imensurável para o desenvolvimento como profissional e pessoal.

A todo o pessoal do Centro de Indexação, pelo companheirismo e auxílio em especial “Carzin”, Jaci e Luciana.

Aos companheiros do Departamento de Fitopatologia, pelos bons momentos, companheirismo em sala de aula, dentro dos laboratórios, Gustavo, Aurivan, André, Daniele, Bruno, William.

Aos grandes amigos que fiz durante este período, Fabrício, Patrick, Marcelo, Samuel, Thais Barros, Thaís Teixeira, Thais Ramalho, Letícia e Ingrid, muito obrigado por tudo o que vivemos.

Aos amigos de sempre, que nos reunimos novamente Ana Paula e Gabriel, e aos incomparáveis: Francisco, Helbert, Samuel, Carlos Eduardo, sempre dispostos a ajudar e acompanhar nos momentos difíceis.

A toda minha família, meus irmãos Marcel, Nicolas e Alessandra, que entenderam que é um momento que nem sempre posso estar por perto. A minha namorada Luciana, por esses meses de compreensão.

E a todos que contribuíram de alguma forma, direta ou indiretamente, para conclusão deste trabalho.

O meu muito obrigado!

*“Tudo que uma pessoa pode imaginar,
outras podem tornar real.”*

Júlio Verne

RESUMO

A grande demanda por plantas capazes de apresentar maior produtividade, sem perder a qualidade da produção, gerada pela competitividade do agronegócio mundial, tem feito com que o Brasil necessite recorrer continuamente à importação de materiais vegetais, como sementes verdadeiras ou outra unidade de propagação vegetativa e plântulas. Isso possibilita a obtenção de plantas portadoras de um potencial genético superior, via melhoramento ou plantio direto do material importado. Entretanto, traz o risco iminente de introdução de patógenos exóticos para o país, como bactérias e vírus quarentenários, que são considerados Pragas A1, potencialmente capazes de causar grandes perdas e danos para a agricultura brasileira. Assim sendo, a diagnose desses patógenos no material importado é fundamental para impedir a sua entrada no país, o que, por sua vez, exige o uso de controles positivos e negativos confiáveis, para que não ocorram falsos positivos e/ou negativos. Nesse trabalho, foram clonados, em plasmídeo comercial, fragmentos genômicos de dez vírus quarentenários: *African cassava mosaic virus* (ACMV), *Andean potato latent virus* (APLV), *Banana bract mosaic virus* (BBrMV), *Blueberry leaf mottle virus* (BBLMV), *Impatiens necrotic spot virus* (INSV), *Plum pox virus* (PPV), *Potato mop-top virus* (PMTV), *Potato yellowing virus* (PYV), *Potato virus T* (PVT) e *Tomato bushy stunt virus* (TBSV), com potencial para serem empregados como controles positivos na sua diagnose pela técnica de RT-PCR e PCR. Quando testados eles se mostraram eficientes como controle positivo na detecção dos respectivos vírus, empregando-se os primers especialmente desenhados para essa finalidade. Trata-se de uma alternativa mais segura, dispensando a utilização de controles positivos contendo o patógeno ativo e eliminando risco de uma introdução involuntária.

Palavras-chave: Vírus quarentenários. RT-PCR/PCR. Detecção. Diagnose. Controle positivo.

ABSTRACT

The competitiveness generated by global agribusiness increases the Brazilian demand for plants capable of presenting higher productivity, without losing the quality of production. Therefore, Brazil needs to import vegetable material continuously, such as true seeds or other unit of vegetative propagation and seedlings. This enables to grow plants with a higher genetic potential, through genetic breeding or even by planting the imported material. However, it brings the imminent risk of introducing exotic pathogens into the country, such as quarentenary bacteria and virus, which are considered A1 Pest, potentially capable of causing great damages to Brazilian agriculture. Thus, the diagnosis of these pathogens in the imported material is crucial to prevent their introduction, which requires the use of reliable positive and negative controls, in order to avoid false positive and/or false negative. In this study genomic fragments of ten quarentenary viruses: *African cassava mosaic virus* (ACMV), *Andean potato latent virus* (APLV), *Banana bract mosaic virus* (BBrMV), *Blueberry leaf mottle virus* (BBLMV), *Impatiens necrotic spot virus* (INSV), *Plum pox virus* (PPV), *Potato mop-top virus* (PMTV), *Potato yellowing virus* (PYV), *Potato virus T* (PVT) and *Tomato bushy stunt virus* (TBSV), with potential to be used as positive controls in its diagnosis by RT-PCR and PCR, were cloned into a commercial plasmid. When tested, they behaved as good positive controls for the detection of the respective virus, using the primers designed specifically for this purpose. It is a safer alternative and avoids the need to use live pathogen, eliminating the risk of accidental introduction of exotic viruses in Brazil.

Keywords: Quarantenary viruses. RT-PCR/PCR. Detection. Diagnosis. Positive control.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
2	REFERENCIAL TEÓRICO	13
2.1	Importação de material vegetal e pragas quarentenárias	13
2.2	Virus quarentenários para o Brasil	15
2.2.1	African cassava mosaic virus (ACMV)	16
2.2.2	Andean potato latent virus (APLV)	18
2.2.3	Banana bract mosaic virus (BBrMV)	19
2.2.4	Blueberry leaf mottle virus (BBLMV)	21
2.2.5	Impatiens necrotic spot virus (INSV)	22
2.2.6	Plum pox virus (PPV)	24
2.2.7	Potato mop-top virus (PMTV)	25
2.2.8	Potato yellowing virus (PYV)	27
2.2.9	Potato virus T (PVT)	28
2.2.10	Tomato bushy stunt virus (TBSV)	30
3	MATERIAL E MÉTODOS	32
3.1	Obtenção dos isolados virais	32
3.2	Desenho dos primers	33
3.3	Extração do RNA total	33
3.4	RT-PCR	34
3.5	Preparo das células competentes para realização da clonagem	35
3.6	Clonagem dos fragmentos amplificados por RT-PCR	36
3.7	Purificação dos plasmídeos	37
3.8	Sequenciamento e análise das sequências	38
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
4.1	Desenho dos primers.....	39
4.2	Amplificação dos fragmentos genômicos e clonagem nos plasmídeos.....	39
4.3	Utilização dos plasmídeos na diagnose por PCR e RT-PCR	43
5	CONCLUSÃO	45
	REFERÊNCIAS	46
	ANEXO	61

1 INTRODUÇÃO

O agronegócio é uma das grandes atividades que movem a economia no Brasil. Estima-se que ao final de 2012, o agronegócio deverá ter gerado emprego para um terço da população brasileira economicamente ativa (PEA) e contribuir com mais de 40,5% das exportações totais do país (UR\$ 55,94 bilhões), equivalendo a 34% do produto interno bruto (PIB) (CAVARARO, 2012). Ano após ano, a safra brasileira de grãos bate novo recorde de produtividade, a pecuária tem a maior fatia do mercado internacional e o suco de laranja brasileiro ocupa quase 80% do mercado mundial.

Entretanto, embora o Brasil seja um grande exportador, nem sempre a produção nacional atende a demanda do mercado interno, estando sujeito à importação de diversos tipos de materiais vegetais, como sementes verdadeiras ou unidades de propagação vegetativa como tubérculos, bulbos, e plântulas, como, por exemplo, as de bananeira, oriundas de cultura de tecidos. Segundo dados do MAPA, analisados por Nascimento; Nascimento e Cardozo (2008) o volume das importações de plantas vivas e de produtos de floricultura pelo Brasil, aumentou de 5,88 para 10,79 milhões de dólares na década de 1997-2007. Apesar desses números não serem expressivos, quando comparados com os demais produtos importados pelo Brasil, indica, porém, que o risco de introdução de patógenos, como os vírus, via material vegetal tem sido crescente. Quando se considera também a importação de sementes verdadeiras ou outras unidades propagativas, como tubérculos de batata, esse risco se torna ainda mais evidente. Nos últimos anos, diversos vírus e/ou estirpes de vírus anteriormente ausentes no Brasil, têm sido introduzidos via batata-semente importada (COSTA, 2008; RABELO FILHO, 2008; RIBEIRO, 2007).

Além de material para propagação, no Brasil é essencial que se mantenha um fluxo de intercâmbio de germoplasma vegetal, já que a maioria dos alimentos regulares na mesa dos brasileiros é formada por espécies exóticas. Assim sendo, para garantir o abastecimento do mercado interno existe a necessidade de incorporação frequente de novos acessos aos bancos ativos de germoplasma. Isso permite a manutenção, e mesmo o aumento da produtividade pela inclusão de novos genes que, além de melhorar o desempenho fisiológico da planta, incorpora resistência às pragas e doenças podendo aumentar a sua adaptabilidade e resistência às condições ambientais adversas. As espécies mais trabalhadas por melhoristas têm sido: trigo, soja, sorgo, batata e mandioca (EMBRAPA, 2011), banco de germoplasma de outras plantas como banana e cana-de-açúcar também são constantemente introduzidos. Existem evidências e, em alguns casos a suspeita de que diversos patógenos chegaram ao Brasil via banco de germoplasma provenientes de outras partes do mundo.

Mesmo que o Brasil tenha as suas próprias legislações visando impedir a entrada de material infectado com diversos patógenos, principalmente os ausentes no país, denominados de quarentenários, o monitoramento desse material nos pontos de entrada não é uma tarefa fácil. Os métodos de diagnose devem ser precisos e apresentar alta repetibilidade, pois a ocorrência de falsos positivos pode gerar conflitos internacionais, e os falsos negativos podem permitir a introdução de patógenos com consequências desastrosas para a agricultura nacional.

A diagnose de vírus nos materiais importados tem sido feita principalmente pelos métodos sorológico e PCR (vírus de DNA) e RT-PCR (vírus de RNA). O problema principal é a disponibilidade de controle positivo, que no caso dos vírus quarentenários teria que ser a partícula viral íntegra para os testes sorológicos, uma vez que o antígeno é desenvolvido para a proteína do

capsídeo, no caso da PCR ou RT-PCR, existe a possibilidade de se utilizar um fragmento genômico do vírus como controle positivo, evitando o risco de se manter o patógeno infectivo para essa finalidade.

Com o objetivo de disponibilizar controles positivos para 10 vírus quarentenários, nesse trabalho foram clonados fragmentos genômicos dos mesmos, sendo que oito deles contém o gene da proteína do capsídeo e outros dois contém os únicos fragmentos genômicos disponíveis no banco internacional de genes (GenBank). Em uma etapa posterior foram desenhados e testados os primers para serem utilizados nas técnicas de diagnose via PCR e/ou RT-PCR.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Importação de material vegetal e pragas quarentenárias

O crescente uso de material genético de outros países para melhorar a produtividade de cultivares domésticas, através de propagação e melhoramento, contribui significativamente para o desenvolvimento da agricultura em diferentes regiões do mundo. A demanda por segurança alimentar da população, o uso de variedades selecionadas, mutantes desejáveis e espécies silvestres que tem um grande potencial de impacto econômico, estético e social na agricultura de todos os países, são fatores que estimulam essa prática (FOSTER, 1988). Assim sendo, o intercâmbio de germoplasma entre países é uma prática bastante comum, considerada de grande relevância para a melhoria e diversificação das espécies vegetais de importância econômica. Como exemplo, pode-se citar o caso do Instituto Internacional de Pesquisa de Culturas para Regiões Tropicais Semi-Áridas (ICRISAT), sediado na Índia, que enviou até o momento mais de 4 bilhões de sementes para todo o mundo desde 1974 (OLIVEIRA et al., 2001).

A forma de importação que acarreta maior entrada de material vegetal, potencialmente capaz de veicular pragas e doenças exóticas, é feita por germoplasma vegetal, ou seja, por materiais com genes ou combinações de genes únicos utilizados por melhoristas para desenvolver cultivares com características desejáveis. No Brasil o trabalho que vem sendo feito pela EMBRAPA no âmbito de identificar todo e qualquer material infectado que entre no nosso país, tem mostrado o grande risco ao qual o Brasil tem sido frequentemente exposto (GIMENES, 2003). Isso tem sido confirmado por outros autores, como Marinho et al. (1993), que detectou 12 acessos infectados com patógenos exóticos, quando analisou 387 acessos de germoplasma de batata.

Esses patógenos, se introduzidos no Brasil, poderiam acarretar danos econômicos muito sérios e, em alguns casos, levar a perdas irreversíveis na agricultura.

Para tentar evitar que os materiais vegetais importados sejam veículos de introdução de pragas e patógenos, denominados de quarentenários, o Ministério da Agricultura através da Instrução Normativa nº 1 de 15 de Dezembro de 1998 no anexo 1 estabelece que: “todo material proveniente para pesquisa científica adquirido por doação, deve ter a permissão para importação emitida pelo Departamento de Defesa e Inspeção Vegetal do Ministério da Agricultura, e deve vir acompanhado de um Certificado Fitossanitário de origem. Essa permissão serve para o ingresso de produtos vegetais no país, funcionando principalmente para vegetais geneticamente modificados ou não, sementes, pólen, frutos, estacas ou gemas, bulbos, tubérculos, rizomas, plantas *in vitro*, ou quaisquer partes da planta com capacidade de reprodução ou multiplicação, com destino a pesquisa”.

Além dos materiais para a pesquisa, o Brasil tem importado uma grande quantidade de sementes e outros materiais de propagação vegetativa de diversos países do mundo. Importação de estacas e sementes de plantas ornamentais, sementes de batatas, germoplasma de tomate, mandioca, mudas de banana *in vitro*, estacas de videira (GIMENES, 2012). O fato de importar esse material, com intenção de aumentar, melhorar a produção e a genética do material que temos disponível no país, e com isso podem trazer junto patógenos, como ocorreu em 1970 com a introdução do fungo *Hemileia vastatrix* que infecta o cafeeiro, e causou perdas de UR\$500 milhões (MONACO et al., 1978).

Desse modo, o risco de introdução de patógenos quarentenários é bastante alto, o que requer uso de métodos eficientes para a análise do material importado, antes que esse seja propagado ou plantado no campo. Existem dois

tipos de patógenos quarentenários: os denominados A1 são aqueles que não estão presentes no país ou região e os A2 que, apesar de se encontrarem presentes, possuem distribuição limitada a um estado ou a uma região dentro do estado e são oficialmente controlados pelo órgão de defesa sanitária do país.

O governo brasileiro vem fazendo um grande investimento para proteger o sistema agropecuário nacional. De acordo com o site do governo Controladoria Geral da União o orçamento para o ano de 2011 para ações de segurança, sanidade e qualidade agropecuária alcançou R\$161.000.000,00 de reais. Isso se baseia na demanda crescente de investimentos na obtenção de produtos de origem vegetal com qualidade comercial, sadios, e que possam entrar em mercados que preferencialmente remunerem melhor estes produtos (BRASIL, 2011).

Mesmo com esse investimento, algumas vezes torna-se difícil a análise de patógenos ausentes no país, devido a falta de controles positivos que possam ser utilizados nos métodos de diagnose, para dar maior credibilidade aos resultados obtidos. A disponibilização de controles que pudessem ser utilizados em técnicas com alta sensibilidade como a RT-PCR e PCR, sem necessitar do uso do patógeno infectivo, é uma excelente alternativa para dar maior segurança aos laboratórios que dão suporte à defesa fitossanitária no país.

2.2 Virus quarentenários para o Brasil

De acordo com a Instrução Normativa nº 41, de 1º de julho de 2008, do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) existem 43 virus quarentenários A1, ou seja, que se encontram ausentes no Brasil (BRASIL, 2008). Dentre esses, os dez utilizados nesse trabalho se encontram descritos nos itens a seguir.

2.2.1 *African cassava mosaic virus (ACMV)*

O mosaico da mandioca, causado pelo *African cassava mosaic virus* (ACMV), foi originalmente descrito na Tanzânia por Warburg (1894). Alguns anos depois, Zimmermann (1906) postulou ser essa uma doença de etiologia viral. Desde então, tem se disseminado pelo leste da África, África Central, passando pela Malásia, ilhas do Oceano Índico (Madagascar e Zanzibar) e chegando à Índia. Mesmo a mandioca sendo cultivada em larga escala na América do Sul e Sudeste Asiático, o ACMV não foi detectado nestas regiões (FARGETTE et al., 2006; PATIL; FAUQUET, 2009).

O ACMV pertence à família Geminiviridae, gênero Begomovirus, e possui um genoma composto por duas partículas de DNA circular fita simples (ssDNA), DNA-A e DNA-B, medindo cerca de 20 nm de diâmetro por 30 nm de comprimento. O DNA-A possui cerca de 2779 nucleotídeos e codifica seis proteínas: Rep (proteína associada a replicação), REn (replication enhancement), TrAP (transativador de AV2 e CP), CP (capa proteica), AV2 (proteína associada com movimento) e AC4 (associada a supressão pós-transcricional). O DNA-B possui 2724 nucleotídeos e codifica duas proteínas NSP (transporte nuclear) e MP (proteína de movimento) (BULL et al., 2006; PATIL et al., 2007).

Esse vírus possui uma alta variabilidade genética, de modo que outros cinco variantes genéticos associados ao mosaico da mandioca têm sido propostos: *East African cassava mosaic virus* (EACMV), *East African cassava mosaic Cameroon virus* (EACMCV), *East African cassava mosaic Malawi virus* (EACMMV), *East African cassava mosaic Zanzibar virus* (EACMZV) e *South African cassava mosaic virus* (SACMV) (BULL et al., 2006). Existem evidências de que essa variabilidade estaria relacionada ao processo de adaptação do ACMV encontrado no continente africano por volta do século

XVIII (BULL et al., 2006). Essa hipótese foi reforçada por Tiendébéogo et al. (2012), que analisando um isolado, denominado por ele de *African cassava mosaic Burkina Faso virus* (ACMBFV), verificaram que esse apresentava o DNA-A recombinante, tendo como maior parente ACMV (61,5%) e dois outros begomovirus com DNA monopartido com parentes menores, o *Tomato leaf curl cameroon virus* (ToLCCMV) e *Cotton leaf curl Gezira virus* (CLCuGV). Essa capacidade de recombinação foi interpretada por esses autores como uma estratégia para adaptação ambiental às diferentes regiões onde eles ocorrem.

Os sintomas causados pelo ACMV se caracterizam por mosaico severo, em plantas jovens, com áreas cloróticas que podem variar entre amarelo-pálido a quase branco, podendo o mosaico aparecer também na base das folhas. As regiões cloróticas do mosaico são bem demarcadas e podem ocupar a folha por inteiro ou apenas pequenos pontos. Outros sintomas como distorção e redução na área foliar e enfezamento generalizado também podem ser observados, dependendo da severidade da doença (BRUNT et al., 1996; STOREY; NICOHLS, 1938). Em infecções tardias os sintomas tendem a ser mais brandos nas folhas mais velhas, dificultando, em alguns casos, o reconhecimento da doença em condições de campo, o que favorece a sua disseminação (BRUNT et al., 1996; STOREY; NICHOLS, 1938). Apenas no continente africano as perdas chegam a 2 bilhões de dólares e uma queda de 50% na produção, podendo chegar até 95% na produção (ROJAS et al., 2005).

No campo esse vírus é transmitido pela mosca branca (*Bemisia tabaci*), de modo persistente circulativo, e também pelo plantio de estacas infectadas com o vírus, que é geralmente o modo utilizado para propagação da cultura (LEGG; FAUQUET, 2004). Por esse motivo a sua dispersão é muito eficiente, tornando essa uma das mais importantes doenças que afetam a mandioca nos

locais onde ela ocorre, e não existem relatos da sua transmissão via semente (DUBERN, 1979).

Técnicas sorológicas como DAS-ELISA tem sido utilizadas para detecção do ACMV, sendo que a sua eficiência é maior quando se utiliza como antígeno as folhas jovens infectadas (FARGETTE; THOUVENEL; FAUQUET, 1987). Testes bioquímicos como cDNA e PCR tem se mostrado eficazes nas análises de amostras comerciais, apresentando alto nível de sensibilidade.

Na África, maior produtora de mandioca do mundo, com uma produção na safra de 2008 estimada em 118 milhões de toneladas, o ACMV causou perdas de 19 milhões de toneladas, o que significa cerca de 2,7 bilhões de dólares de prejuízo (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS - FAO, 2012). Na América do Sul, o Brasil, que responde por aproximadamente 75% da produção, com um volume de 35 milhões de toneladas (CAVARARO, 2012) ainda não detectou a presença de ACMV. Como a mosca branca *Bemisia tabaci*, vetor desse vírus, encontra-se no país, a sua presença nos mandiocais poderia causar uma catástrofe de dimensões desconhecidas, dado o seu grande potencial para causar perdas na produção.

2.2.2 Andean potato latent virus (APLV)

O *Andean potato latent virus* (APLV), descrito pela primeira vez por Gibbs; Hecht-Poinar e Woods (1966), como originário da região dos Andes, encontra-se espalhado por uma boa parte da região Andina da América do Sul, Bolívia, Colômbia, Equador e Peru, especialmente em altas altitudes (KOENIG; FRIBOURG; JONES, 1979).

O vírus pertence à família Tymoviridae, gênero Tymovirus, e possui uma partícula isométrica com 30 nm de diâmetro (GIBBS; HECHT-POINAR;

WOODS, 1966). Esse vírus não tem sido amplamente estudado, de modo que o único fragmento genômico disponível no GenBank é da região 3' da proteína envolvida na replicação viral e parte da região 5' da proteína do capsídeo. Sabe-se, entretanto, que o membro tipo desse gênero, o *Turnip yellow mosaic virus* (TYMV) é composto por ssRNA positivo, com cerca de 6300 nucleotídeos, que codificam 4 proteínas: uma proteína de movimento (MP), duas proteínas envolvidas na replicação viral e uma proteína do capsídeo (CP).

Os sintomas causados pelo APLV se caracterizam por mosaicos que variam de leves a intensos, manchas cloróticas e rugosidade, dependendo da suscetibilidade da cultivar de batata (JONES, 1978). Sua transmissão ocorre de modo não persistente por besouros (*Epirix* spp), facilmente encontrado em território nacional, principalmente nas regiões produtoras de batata, como Minas Gerais. A transmissão também pode ocorrer por inoculação mecânica, enxertia, contato entre plantas e por sementes contaminadas de batata (JONES; FRIGOURG, 1977).

Sendo a batata a principal hortaliça produzida no país, com área cultivada de 145 mil hectares e produção aproximada de 3,5 milhões de toneladas (CAVARARO, 2012), esse vírus poderia ter sérias consequências se viesse a ser introduzido no Brasil. Países que dividem fronteira com o Brasil tem grande incidência deste vírus, que por ser de fácil transmissão e disseminação no campo, exige cuidados fitossanitários rigorosos para impedir a sua introdução no território nacional.

2.2.3 *Banana bract mosaic virus* (BBrMV)

O *Banana bract mosaic virus* (BBrMV), foi descrito inicialmente por Thomas e Magnaye (1996), nas Filipinas, e posteriormente na Índia, Sri Lanka,

Vietnam, Samoa, em alguns países da África como Uganda, Gana, Zanzibar e África do Sul (RODONI et al., 1997).

O BBrMV pertence à família Potyviridae, gênero Potyvirus, e possui uma partícula flexuosa, medindo cerca de 750 x 12 nm, com ssRNA positivo. O seu genoma contém cerca de 9710 nucleotídeos, incluindo os terminais 5'UTR, 3'UTR. Possui um Cap no terminal 5' e uma calda PoliA no terminal 3', sendo que o seu genoma possui uma única ORF que codifica uma poliproteína, posteriormente clivada gerando 10 proteínas funcionais, sendo; P1 protease, HC-Pro proteína de movimento, P3 replicação, 6k1, CI replicação, 6k2, VPg, NIa-Pro protease, NIb replicase e CP capa proteica (HA et al., 2008).

Os sintomas do vírus ocorrem na forma de estrias cloróticas nas folhas e brácteas, provoca a disposição em leque das folhas e redução no tamanho dos frutos. As frutas com sintomas desse vírus não ganham peso e são rejeitadas para comercialização, podendo induzir perdas significativas de produtividade, que podem chegar a 70% em diversas partes do mundo onde esse vírus ocorre (CHERIAN et al., 2002; RISH, 2009; SELVARAJAN; JEYABASKARAN, 2006). Roperos e Magnaye (1991) relatou que, no sul das Filipinas, uma epidemia de BBrMV causou a destruição de mais de 25000 pés de banana.

A transmissão do BBrMV no campo é feita por diversas espécies de afídeos como *Aphis gossypii*, *Rhopalosiphum maidis* e *Pentalonia nigronervosa*, de forma não persistente, ou estiletar (RIVERA; RAMIREZ; PEREIRA, 1993).

Rodoni; Dale; Harding (1999) testou mudas provenientes do Oeste da Samoa, e identificou uma infecção dupla por BBrMV e BSV (*Banana streak virus*) em uma bananeira apresentando sintomas apenas de BSV, observando que esse pode camuflar os sintomas de BBrMV.

O Brasil tem produção que chega a 7 milhões de toneladas/ano, em uma área de 494 mil hectares (FAO, 2012), entretanto a produtividade é baixa quando

comparada ao Equador que chega a 8 milhões de toneladas/ano em uma área de pouco mais de 215 mil hectares (FAO, 2012). Assim sendo, impedir a entrada do BBrMV no país é de grande importância para proteger a bananicultura nacional.

2.2.4 *Blueberry leaf mottle virus (BBLMV)*

O *Blueberry leaf mottle virus* (BBLMV), foi descrito por Ramsdell em 1980. Este vírus é encontrado no continente europeu na Bulgária, Hungria, Portugal, América do Norte, Canadá e Estados Unidos (BACHER et al., 1994).

O BBLMV pertence à família Secoviridae, gênero Nepovirus, e tem o genoma bipartido, com ssRNAs positivos, com cauda PoliA, que são encapsulados em duas partículas isométricas de 28nm (HARRISON; MURANT, 1977). O RNA-1 e o RNA-2 codificam poliproteínas que posteriormente serão clivadas em proteínas funcionais. O RNA-1 possui 1908 nucleotídeos, e na região 3' UTR, codifica uma poliproteína de função ainda não elucidada, enquanto que o RNA-2 contém 3082 nucleotídeos e codifica uma poliproteína, posteriormente clivada em duas proteínas, sendo capa proteica e uma segunda proteína com função proteolítica (BACHER et al., 1994).

Os sintomas caracterizam por deformação nas folhas em forma de meia lua, manchas avermelhadas na base das folhas e hastes. As flores podem ter uma coloração rosada ou estrias vermelhas, e os frutos permanecem vermelhos ao invés de ficarem azuis com o amadurecimento (RAMSDELL; STATE-SMITH, 1980; 1981).

O vírus é transmitido pelo pólen, abelhas (*Apis mellífera* L.), sementes contaminadas com o vírus e inoculação mecânica. Não existem registros de transmissão por vetores, apesar de fazer parte do gênero Nepovirus, não foram ainda encontradas evidências de sua transmissão via nematóides (CHILDRESS;

RAMSDELL, 1987). O afideo *Illinoia pepperi* MacG, é um vetor conhecido para *Blueberry shoestring virus* (BBSSV), e também pode ser considerado como um possível vetor para BBLMV (GILLET, 1982).

A certificação do material para plantio e o *roguing* das plantas infectadas são as formas de prevenção adotadas nas regiões onde o vírus ocorre. Recomenda-se que na eliminação das plantas essas sejam arrancadas pela raiz para que não rebrotem, constituindo uma fonte de inóculo e possam ser transmitidas por abelhas, via pólen contaminado.

Os Estados Unidos é o país com maior produção de mirtilo, chegando a aproximadamente 188000 toneladas de mirtilo por ano, com uma área plantada de 27684 hectares (FAO, 2012). No estado do Michigan cultivares de mirtilo tiveram perdas de 100% da produção, causados pelo BBMLV (RAMSDELL; STATE-SMITH, 1983). No Brasil, o estado do Rio Grande do Sul é o maior produtor de mirtilo com uma área ocupada de 65 hectares e uma produção anual de 150 toneladas (CAVARARO, 2012). Esse vírus, se introduzido no país poderia ser mais um fator de perdas para essa cultura.

2.2.5 *Impatiens necrotic spot virus* (INSV)

O *Impatiens necrotic spot virus* (INSV), tem sua origem ainda desconhecida, mas relatos informam a ocorrência de prejuízos nas culturas de flores, anteriores a 1980, nos Estados Unidos, Havaí e México (DAUGHTREY, 1997; LAW; MOYER, 1990; ULLMAN et al., 2002). Sua rápida expansão foi notada em outros países, sendo relatada por toda a Europa Ocidental, na América Central em Costa Rica, na Ásia em Israel, Japão, China e Índia (SAKURAI; INOUE; TSUDA, 2004).

O INSV pertence à família Bunyaviridae, gênero Tospovirus, e possui como genoma ssRNA negativo, dividido em três partes, L (*large*), M (*middle*) e S (*small*), sendo que todos são encapsulados em uma única partícula medindo 80 a 120 nm, recoberta com um envelope. O RNA L possui cerca de 8776 nucleotídeos, que codificam uma RNA polimerase (HA et al., 1991). O RNA M possui 4960 nucleotídeos, que codificam duas proteínas, a proteína de movimento e a precursora das glicoproteínas F1 e G2 (CHENG; DONG; ZHANG, 2009). A RNA S tem 2982 nucleotídeos que codifica duas proteínas, proteína núcleo capsidial e uma proteína envolvida na supressão do silenciamento gênico (CHENG; DONG; ZHANG, 2009).

Os sintomas podem variar muito de acordo com a espécie infectada, causando nanismo nas plantas, manchas marrom e roxa nas folhas e hastes, endurecimento da haste, quebra da flor e morte (DAUGHTREY et al., 1997). Alguns sintomas podem facilmente ser confundidos com os causados por outras doenças como de outros vírus, fungos, bactérias ou mesmo distúrbios nutricionais (LAW; SPECK; MOYER, 1992).

O INSV é transmitido exclusivamente por trips, *Frankliniella occidentalis*, *F. intonsa* e por *F. occidentalis*, de modo persistente propagativo. A aquisição do vírus se dá quando o trips se encontra na forma de larvas, mas o adulto é capaz de transmitir durante toda a sua vida, 5 a 30 minutos após ter se alimentado (SAKURAI; INOUE; TSUDA, 2004; WIJKAMP; PETERS, 1993).

Apenas no estado da Pensilvânia, durante um ano, entre 1989 e 1990 as perdas causadas por esse vírus totalizaram US\$675.000 dólares (HAUSBECK et al., 1992). Nota-se, portanto, que esse vírus tem um grande potencial para causar perdas, considerando-se que o mercado brasileiro de plantas ornamentais chega a R\$ 600 milhões de reais, tendo o estado de São Paulo como maior produtor e o Distrito Federal como maior consumidor.

2.2.6 *Plum pox virus* (PPV)

O *Plum pox virus* (PPV) foi inicialmente descrito na Bulgária por volta de 1915, em plantações de ameixa e por volta de 1933 em damasco (ATANASOFF, 1932; 1935). Desde então ele disseminou por toda Europa, Alemanha em 1956, Polônia e Rússia em 1961, França em 1970, e assim rapidamente ocupando toda a Europa Ocidental. Em 1992, sintomas de PPV foram encontrados no Chile, na Costa Leste dos Estados Unidos, e por volta de 1999, na Índia e no Japão (HERNÁNDEZ et al., 2007; MAEJIMA et al., 2010; ROY; SMITH, 1994; THAKUR et al., 1994).

O PPV pertence à família Potyviridae, gênero Potyvirus, é composto por uma partícula flexuosa, medindo cerca de 750 x 12 nm. Seu genoma é composto por uma molécula de ssRNA positivo, com 9741 nucleotídeos, incluindo os terminais 3'UTR e 5'UTR. Possui uma proteína VPg (viral protein linked to genome) no terminal 5', e uma calda PoliA no terminal 3'. Sua única ORF codifica para uma poliproteína, que posteriormente é processada em 10 proteínas; P1 protease, HC-Pro proteína de movimento, P3 replicação viral, 6k1, CI replicação, 6k2, VPg, NIa protease, NIb replicase e capa proteica (MAISS et al., 1988). Sete estirpes do PPV são reconhecidas: D (Dideron), M (Marcus), Rec, EA (El Amar), C (Cherry), W e T (SERÇE et al., 2009).

Os sintomas induzidos pelo PPV nas plantas hospedeiras são manchas verde-claras nas folhas, anéis ou linha cloróticas, que com o tempo se tornam necróticas. Ocorre ainda clareamento das nervuras e distorção das folhas. Os frutos imaturos podem mostrar manchas ou anéis que tendem a desaparecer quando o fruto está maduro. As frutas apresentam baixo teor de açúcar, queda prematura e má formação (DUNEZ, 1987).

A transmissão do PPV ocorre por afídeos (*Aphis craccivora*, *A. spireacola*, *Brachycaudus helichrysi*, *B. cardui*, *Myzus persicae*, *M. varians*, *M. Phorodon humuli*) de forma não persistente ou estiletar (KEGLER et al., 1997; KUNKE; KRCZA, 1971; LECLANT 1973). Outra forma de transmissão ocorre por inoculação mecânica, enxertia e semente (NEMET; KOLBER, 1983). Na Europa o PPV é considerado o patógeno viral de maior capacidade destrutiva em espécies de fruteira de caroço (*Prunus* spp.) como ameixa, damasco e pêssigo (NEMETH, 1986).

A produção mundial de frutas de caroço chega a 564.708 toneladas por ano, e estima-se que o impacto econômico causado pelos prejuízos associados ao PPV chegue a 640 milhões de dólares por ano (CAMBRA, 2009). No Brasil, o estado do Paraná é o maior produtor chegando a 18 mil toneladas na safra 2009 (PERIN, 2012). Levando em consideração a forma em que a doença vem se disseminando e a disponibilidade de espécies de afídeos vetores no Brasil, além do fato de que um país vizinho como o Chile já constatou sinais da doença, é de grande importância que os cuidados devidos sejam tomados, para que não haja a introdução desse patógeno em território nacional.

2.2.7 *Potato mop-top virus* (PMTV)

O *Potato mop-top virus* (PMTV) foi descrito pela primeira vez no início dos anos 60 na Escócia por TODD (1965) e posteriormente no Reino Unido (CALVERT; HARRISON, 1966). Acredita-se que a sua provável origem seja nos Andes, na região da América do Sul (HINOSTROZA; FRENCH, 1972). Desde então, ele tem se disseminado pela América Central, América do Norte, Ásia e Europa. No entanto, países nórdicos como Noruega, Suécia, Dinamarca e Finlândia, têm sofrido bastante com esses vírus pelo menos há quatro décadas

(BJÖRNSTAD, 1969; IMOTO et al., 1981; MØLGAARD; NIELSEN, 1996; MONTERO-AUSTUA et al., 2008; NAKAYAMA et al., 2010; NIELSEN; ENGSBRO, 1992; NIELSEN; MØLGAARD, 1997).

O PMTV pertence à família Virgaviridae, gênero Pomovirus, que possui três partículas tubulares e rígidas, medindo com 18-20 nm de diâmetro e 100-150 nm ou 250-300 nm de comprimento, encapsulando três RNAs denominados de RNA-1, RNA-2 e RNA-3. O RNA-1 possui 6043 nucleotídeos, e codifica uma proteína RnRP (replicase) e uma proteína sem função definida. O RNA-2 contém 2940 nucleotídeos com quatro ORFs que codificam 3 proteínas que compõem o bloco triplo (TGB), envolvido no movimento célula a célula, e uma proteína rica em cisteína. O RNA-3 contém 3134 nucleotídeos e codifica duas proteínas, a capa proteica e uma proteína sem função definida. Todos os RNAs tem uma estrutura semelhante ao tRNA (tRNA-like) na região 3' terminal (KASHIWAZAKI et al., 1995; SANDGREN et al., 2001; SAVENKOV; SANDGREN; VALKONEN, 1999; SCOTT et al., 1994).

Os sintomas induzidos pelo PMTV podem variar de ano pra ano, de cultivar para cultivar e até mesmo no campo (LATVALA-KILBY et al., 2009; SANDGREN, 1995). Os sintomas que são considerados mais comuns na infecção primária são de ferrugem ou cor preta nas nervuras, arcos e anéis sobre a superfície dos tubérculos ou mesmo arcos internos e manchas marrons na polpa do tubérculo (HARRISON, 1974). Em infecções secundárias ou em plantas provenientes de tubérculos infectados na estação anterior, podem apresentar rachaduras, depressões na superfície ou distorções (CARLVERT, 1966; HARRISON; JONES, 1970). O efeito no crescimento da planta varia em gravidade de acordo com a cultivar. Nas folhas os sintomas podem variar de manchas amarelas pálidas ou amarelas, encurtamento das hastes, dando a

impressão de uma planta anã, e em alguns casos apenas as hastes são infectadas (CALVERT, 1968; TORRANCE, 1992).

Em condições de campo o vírus é transmitido por zoósporos do fungo *Spongospora subterranea* f. sp. *subterranea*, sendo seu único vetor de transmissão. Este fungo foi encontrado na região de São João da Boa Vista, São Paulo, como causador de outra patologia (MIRANDA, 1989). Desde 1980, o PMTV tem causado grandes perdas econômicas na produção de batata nos países nórdicos Suécia, Noruega, Finlândia e Dinamarca (MØLGEERD; NIELSEN, 1996).

O mercado mundial de batata produziu, no ano de 2010, aproximadamente 325 milhões de toneladas, sendo que deste total, 3.5 milhões foram produzidas no Brasil (FAO, 2012), isso significa que a introdução desse vírus poderia vir a ter um impacto considerável na bataticultura brasileira.

2.2.8 *Potato yellowing virus* (PYV)

O *Potato yellowing virus* (PYV) foi inicialmente relatado em 1992 nos campos de cultivo de batata (*Solanum tuberosum*) na região do Peru e, poucos anos depois, foi também encontrado em cultivares selvagens de batata (*S. fernandezianum*) no Chile (SILVESTRE; UNTIVEROS; CUELLAR, 2011).

O PYV é membro da família Bromoviridae, gênero Alfamovirus, e se encontra disseminado no Peru, Chile e Bolívia (FUENTES; JAYASINGHE, 1993; VALKONEN et al., 1992). Seu genoma é composto por cinco partículas baciliformes, medindo de 21 a 368 nm de comprimento por 25 nm de diâmetro (VALKONEN et al., 1992). O membro desse gênero é o *Alfalfa mosaic virus* (AMV), cujo genoma consiste de quatro RNAs fita simples positivo denominados RNA-1, RNA-2, RNA-3 e RNA-4. RNA-1 e RNA-2 produzem

proteína P1 e P2 replicase, respectivamente. O RNA-3 codifica a proteína de movimento (PM) e a capa proteica (CP); o RNA-4 é homólogo ao terminal 3' do RNA-3 e é considerado um eficiente RNA subgenômico que codifica a CP (BOL; VLOTEN-DOTING; JASPARS, 1971; ERNY et al., 1992; GOUD; SYMONS, 1978; GUNN; SYMONS, 1980; KOPER-ZWARTHOFF et al., 1979; STUSSI-GURAUD et al., 1987). Todos os RNAs têm como característica geral, a estrutura CAP no terminal 5' e a estrutura tRNA-like na região 3' (BOLL, 1999; BREDERODE; KOPER-ZWARTHOFF et al. 1979; TENLLADO; BOL, 2000; VAN DER VOSSSEN; NEELEMAN; BOL, 1994).

Os sintomas induzidos pelo PYV se caracterizam por mosaico, amarelecimento e senescência prematura da planta, além de necrose e redução no tamanho das sementes, infecções assintomáticas podem ocorrer (VALKONEN et al., 1992).

Sua transmissão ocorre de forma semi-persistente pelo afideo *Myzus persicae* e via sementes, chegando a 20% de eficiência, mas a transmissão via pólen não foi observada. Sendo a batata de propagação vegetativa, o vírus pode ser facilmente transmitido por tubérculos (VALKONEN et al., 1992).

O PYV é um vírus pouco estudado, justamente por isso poucos dados são encontrados a respeito de estrutura, transmissão e principalmente o impacto que ele pode causar na lavoura, entretanto deve ser considerado como causador potencial de perdas, devendo ser evitada a sua entrada no Brasil.

2.2.9 *Potato virus T (PVT)*

O *Potato virus T* (PVT) foi descrito pela primeira vez por Salazar e Harrison (1977a) na América do Sul, como ocorrendo no Peru e na Bolívia, mas

possivelmente ocorre de forma mais ampla na região andina da América do Sul (SALAZAR; HARRISON, 1978).

O PVT faz parte da família Betaflexiviridae, gênero Tepovirus, possui uma partícula flexuosa de 640 x 12 nm e um ssRNA positivo (SALAZAR, 1977). Seu genoma é composto por 6539 nucleotídeos, não incluindo calda PoliA da região 3', o 5'URT terminal e 3'UTR terminal. O genoma contém três ORFs que codificam a replicase, a proteína de movimento e a proteína do capsídeo (CP) (RUBINO et al., 2012; RUSSO et al., 2009).

Os sintomas induzidos por esse vírus nas plantas hospedeiras aparentemente não são observados na infecção primária. Apenas algumas cultivares altamente suscetíveis como King Edward, podem mostrar necrose leve, manchas cloróticas, e a cv. Cara que apresentou o máximo de necrose aos 12 dias após a inoculação. Em casa de vegetação, as plantas com infecções secundárias também podem se mostrar assintomáticas (SALAZAR; HARRISON, 1977b).

A transmissão ocorre por tubérculos contaminados e mecanicamente no contato entre plantas. Transmissão via semente foi observada apenas em *Datura stramonium* (JONES, 1982). Não são conhecidos vetores ou transmissão por afídeos (SALAZAR; HARRISON, 1977b).

Testes sorológicos são complicados, visto que o vírus é moderadamente imunogênico. ELISA pode ser útil para a detecção do vírus, mas ainda foi pouco trabalhada (SCHROEDER; WEIDEMANN, 1990; VERNON-SHIRLEY et al., 1993). Assim sendo, a técnica PCR se mostra como uma excelente alternativa, pois se baseia na detecção do ácido nucléico já conhecido, podendo então ser considerada a mais adequada para diagnose desse vírus em material contaminado.

2.2.10 *Tomato bushy stunt virus (TBSV)*

O *Tomato bushy stunt virus* (TBSV), é encontrado cobrindo quase todos os países da Europa, América do Norte, diversas regiões da América do Sul e Norte da África (MARTELLI; GALLITELLI; RUSSO, 1988).

O TBSV pertence à família Tombusviridae, gênero Tombusvirus, e possui partícula isométrica medindo 30 nm de diâmetro. O seu genoma é ssRNA positivo, contendo 4776 nucleotídeos, incluindo os terminais 5'UTR e 3'UTR, com cinco ORFs que codificam uma proteína sem função definida, a RNA polimerase, a capa proteica, a proteína de movimento e uma proteína que pode estar ligada à indução de necrose e movimento à longas distâncias (OSTER; WU; WHITE, 1998; SCHALTHOF, 1995; ZHANG, SLOWINSKI; WHITE, 1999).

Os sintomas induzidos pelo TBSV podem variar com a hospedeira e com o meio ambiente, principalmente com o fotoperíodo e a temperatura. Plantas infectadas podem apresentar nanismo, manchas cloróticas, enrugamento e deformação, além de necrose em folhas de tomate e pimenta (LUIZ-ARTEAGA et al., 1996). Nas duas culturas, o fruto tem a sua massa e tamanho drasticamente reduzidos, estrias, anéis e necrose (KOENIG; KUNZE, 1982). No caso de berinjela ele causa nanismo, amarelecimento e manchas nas folhas, deformação e necrose nos frutos (CHERIF; SPIRE; HASNI, 1983; LUIZ-ARTEAGA, 1996), além de má formação foliar, mosaico e às vezes a morte da planta. Intensa necrose pode ser observada nas folhas e pétalas de tulipas (KRCZAL; BEUTEL, 1994). Em cerejeira e maçã ocorrem necrose e déficit no crescimento das frutas (ALLEN, 1969; BORGES; SEQUEIRA; LOURO, 1979; GERIK et al., 1990; MARTINEZ; GALINDO; RODRIGUEZ, 1974).

Não existem indícios de sua transmissão por vetores, tanto voadores quanto os que habitam o solo. Informações de transmissão por afídeos também não foram encontradas (ALLEN, 1969; 1967). O vírus pode ser transmitido por inoculação mecânica, por enxertia, mas não é transmitido pelo contato entre plantas. Sua transmissão via semente tem eficiência de até 65% em sementes de pimenta, tomate e maçã. Foram também encontradas partículas virais em semente e pólen de cerejeira (ALLEN 1969; ALLEN; DAVISON, 1967).

Segundo dados de 2010 da FAOSTAT, a produção mundial de tomate chegou a 146 milhões de toneladas, sendo o Brasil responsável por 3,6 milhões de toneladas. A produção de pimenta alcançou 396 mil toneladas com o Brasil produzindo 50 mil toneladas. Não foram encontrados dados confiáveis sobre a perda causada por este vírus, mas visualizando a produção nacional, o tamanho do impacto causado pela introdução desse vírus poderia ser considerável.

3 MATERIAL E MÉTODOS

A grande maioria das atividades foi realizada no Laboratório de Virologia Molecular da Universidade Federal de Lavras (UFLA), localizado no Departamento de Fitopatologia (DFP).

3.1 Obtenção dos isolados virais

Nessa fase do trabalho foram obtidos os seguintes isolados virais: *African cassava mosaic virus* (ACMV) (RNA extraído e fornecido pela Bioreba[®] - Suíça e controle positivo fornecido pela Agdia[®] – USA, RNA extraído nos Estados Unidos); *Andean potato latent virus* (APLV) (RNA extraído e fornecido pela Bioreba[®] - Suíça e controle positivo fornecido pela Agdia[®] – USA, RNA extraído nos Estados Unidos); *Banana bract mosaic virus* (BBrMV) (controle positivo fornecido pela Agdia[®] – USA, RNA extraído nos Estados Unidos); *Blueberry leaf mottle virus* (BBLMV) (controle positivo fornecido pela Agdia[®] – USA, RNA extraído nos Estados Unidos); *Impatiens necrotic spot virus* (INSV) (RNA extraído e fornecido pela Bioreba[®] - Suíça); *Plum pox virus* (PPV) (RNA extraído e fornecido pela Bioreba[®] - Suíça e controle positivo fornecido pela Agdia[®] – USA, RNA extraído nos Estados Unidos); *Potato mop-top virus* (PMTV) (RNA extraído e fornecido pela Bioreba[®] - Suíça e controle positivo fornecido pela Agdia[®] – USA, RNA extraído nos Estados Unidos); *Potato yellowing virus* (PYV) (controle positivo fornecido pela Agdia[®] – USA, RNA extraído nos Estados Unidos), *Potato virus T* (PVT) (folhas infectadas desidratadas fornecidas pelo Dr. Giovanni Martelli do Department of Plant Protection, University of Bari – Itália – RNA extraído na Holanda); *Tomato bushy stunt virus* (TBSV) (RNA extraído e fornecido pela

Bioreba[®] - Suíça e controle positivo fornecido pela Agdia[®] – USA, RNA extraído nos Estados Unidos).

3.2 Desenho dos primers

O desenho dos primers levou em consideração as sequências disponíveis no GenBank. Estas sequências foram alinhadas com o auxílio do programa ClustalW (CHENNA et al., 2003), com objetivo de identificar os segmentos mais conservados na região de interesse do genoma. Os primers foram desenhados com o auxílio do programa OligoAnalyzer, da empresa IDT, de modo a flanquear o gene da capa proteica do vírus nas regiões 5' e 3'. Assim sendo, o tamanho do fragmento variou de acordo com o tamanho do gene do capsídeo, de cada uma das espécies trabalhadas. No caso dos vírus que ainda não tinham a sequência desse gene disponível no GenBank, como o APLV e o PYPV, os primers foram desenhados na região que se encontrava depositada no banco de dados. Primers internos à sequência clonada também foram desenhados, para serem empregados na diagnose, gerar fragmentos com tamanhos máximos em torno de 700 pb. Para confirmar a especificidade dos primers em relação ao genoma viral, estes foram analisados e comparados com os genomas disponíveis no GenBank, utilizando-se a ferramenta BLAST (Basic Local Alignment Search Tool), disponível *online* no *website* do NCBI (NATIONAL CENTRE FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION - NCBI, 2012).

3.3 Extração do RNA total

O RNA total foi extraído com o auxílio do Kit da Qiagen[®], utilizando-se as recomendações do fabricante e/ou pelo método do Trizol (AFGC Protocols,

2002), como segue: 1g de folhas infectadas foram macerados em almofariz com o auxílio do pistilo, na presença de nitrogênio líquido. Ao pó obtido foram acrescentados 15 mL de Trizol (38% de Fenol saturado, 0,8M de tiocianato de guanidina, 0,4M de tiocianato de amônia, 0,1M de acetato de sódio pH 5, 50mL de glicerol e quantidade de água ultra pura suficiente para 1 litro de solução). Após a homogeneização foi incubado por 5 minutos a 60 °C, agitado duas vezes em vórtex por 15 segundos e centrifugado a 12.000g por 10 minutos a 4° C. Após a centrifugação o pellet foi descartado e o sobrenadante transferido para outro tubo, adicionando-se 3 mL de clorofórmio, com posterior agitação em vórtex por 15 segundos. Após incubação a temperatura ambiente por 2 a 3 minutos, o material foi novamente centrifugado a 10.000 g por 15 minutos a 4° C. A fase aquosa foi cuidadosamente transferida para um novo tubo, adicionando-se isopropanol e 0,8M de citrato de sódio/1,2M de NaCl, na quantidade de ½ do volume da fase aquosa. Misturou-se levemente por inversão e deixou-se a temperatura ambiente por 10 minutos, para a precipitação do RNA. Após nova centrifugação a 10.000 g por 10 minutos a 4°C, o precipitado foi lavado com 20 mL de etanol a 75%, agitando em vórtex e centrifugando a 10.000g por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado, o precipitado secado a vácuo e ressuspenso em 250 µl de água ultrapura tratada com DEPC. O RNA foi checado por eletroforese em gel de agarose a 0,7%, contrastado com GelRed (Invitrogen®) e observado em trans-iluminador, sob luz ultravioleta.

3.4 RT-PCR

A síntese do cDNA foi realizada utilizando-se os primers antisenso, listados na Tabela 1, e a enzima transcriptase reversa da M-MLV RT da Promega®, como segue: 2,5µl do RNA total foram misturados com 1,0 µL do

primer antisense e 11,5µl de água ultra pura tratada com DEPC, aquecidos a 70° C por 10 minutos e colocados rapidamente no gelo. Em seguida foram acrescentados 5µl do tampão da RT, 2µl de dNTPs (10mM), 0,8µl de M-MLV RT (Promega®) e 2,2µl de água ultra pura tratada com DEPC, seguido por incubação a 49° C por 1 hora e a 70° C por 15 min.

Na reação de PCR foram utilizados 1µl do cDNA sintetizado, 5µl do tampão de PCR 5X, 1,5µl de MgCl₂ (25mM), 0,5 µl de dNTPs (10mM), 1,25 µl de cada primer (senso e antisense a 10 pM), 0,125µl de GoTaq DNA polimerase (Promega®) e 14,375µl de água ultra pura tratada com DEPC. O produto da amplificação foi analisado por eletroforese em gel de agarose a 0,7% contrastado com GelRed (Invitrogen) e visualizado no trans-iluminador, sob luz ultravioleta.

3.5 Preparo das células competentes para realização da clonagem

As células competentes de *Escherichia coli*, foram preparadas com a cepa comercial DH5α, da Invitrogen®, que tem sido mantida armazenada em congelador a -80°C. Inicialmente essas foram descongeladas em recipiente com gelo e repicadas em placas de Petri em meio LB sólido, ficando de um dia para o outro em incubação a 37°C. Após o crescimento das colônias, três das mais robustas foram escolhidas e cada uma delas colocadas para crescer de um dia para o outro, a 37°C, em 5 mL de meio líquido SOB, em tubo de ensaio inclinado, com agitação de 400 rpm. No dia seguinte 1 µl da suspensão bacteriana foi transferido para um erlenmeyer de 250mL, contendo 10mL de meio SOB e colocado sob agitação (275 rpm) a 37 °C por duas horas. Após esse período, transferiu-se esse meio para um erlenmeyer de 1 litro, contendo 90 mL de meio SOB e continuou-se a incubação com agitação, até que a concentração de colônias, medida em espectrofotômetro a 660 nm, gerasse uma OD = 0,5

(concentração aproximada de $4-7 \times 10^7$ células viáveis/mL). Após atingir o valor desejado, o frasco foi imediatamente colocado em gelo e a suspensão bacteriana distribuída em tubos para centrifugação a 2500rpm por 12 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuscitado em 30 mL de FSB (10mM KOAc, 100 mM KCl, 45 mM MnCl₂, 10 mM CaCl₂, 3 mM HAcCoCl₃ e 10% de Glicerol redistilado, pH 6,4 e filtragem em filtro 25 µ), e colocado em gelo por 15 minutos. Em seguida foi feita nova centrifugação a 2500rpm por 10 minutos a 4°C, e o precipitado ressuscitado em 8 mL de FSB, adicionando-se 280 µl de DMSO, com leve agitação, e incubação no gelo por 5 minutos. Depois a suspensão bacteriana foi distribuída em tubos eppendorf de 1,5 ml (50 µl por tubo) e armazenadas em freezer a -80° C.

3.6 Clonagem dos fragmentos amplificados por RT-PCR

As bandas referentes aos fragmentos genômicos dos vírus, amplificados por PCR, foram purificadas a partir de gel de agarose, com o auxílio de kits comerciais de purificação de DNA (Promega: Wizard[®] SV Gel PCR Clean-Up System, NORGEN: PCR Purification Kit e DNA Gel extraction kit), e clonadas no plasmídeo pGEM-T Easy Vector (Promega[®]) seguindo as instruções do fabricante. Esse plasmídeo foi então empregado para transformar células competentes de *Escherichia coli* (DH5a Competent Cell), por meio da seguinte metodologia: 2 µL do plasmídeo pGEM-T Easy Vector (Promega[®]), supostamente contendo o fragmento clonado, foram colocados no tubo eppendorf de 1,5 mL, contendo 50 µL de células competentes preparadas conforme descrito anteriormente, e colocadas em gelo moído por 30 minutos. Em seguida foram aquecidas a 42 °C em banho-maria por 60 segundos, colocadas no gelo durante 5 minutos e adicionados 280 µL do meio de cultura

líquido SOC. Os tubos foram então incubados a 37 °C, com agitação, durante 1 hora, e as células bacterianas foram plaqueadas em meio sólido LB (Luria Bertani), contendo 1µL/mL do antibiótico ampicilina (na concentração de 100 µg/mL), 25 µL de X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactosidase a 20 mg/mL) e 25 µL IPTG (Isopropyl-β-D-thiogalactoside a 0.1M) e incubadas a 37 °C 'overnight'. No dia seguinte as colônias bacterianas hialinas foram repicadas, individualmente, para tubos de ensaio medindo 18x180 mm, contendo 5 mL do meio líquido LB, acrescido de 1µL/mL do antibiótico ampicilina (100 µg/ml), e incubadas de um dia para o outro com agitação por 14 h a 37 °C. Os plasmídeos foram então purificados, checados para confirmar a clonagem do inserto e enviadas para sequenciamento.

3.7 Purificação dos plasmídeos

A purificação dos plasmídeos foi feita de acordo com o protocolo descrito por Zhou; Yang; Jong, (1990). A suspensão bacteriana obtida conforme descrição no item anterior, foi transferida para um tubo eppendorf de 1,5 mL e centrifugadas brevemente por 10 segundos a 14.000 rpm. O sobrenadante foi descartado, deixando-se entre 50 µl e 100 µl, e o precipitado foi ressuscitado por agitação em vórtex. Em seguida acrescentaram-se 300µL do tampão TENS (0,5mL de Tris-HCl 1M, pH8, 0,1 mL de EDTA 0,5M, pH8, 0,5mL de NaOH a 10%, 1,25 mL de SDS a 20%, completando-se o volume para 50mL com água ultra pura autoclavada) com nova agitação em vórtex. Em seguida adicionaram-se 150µL de NaOAc pH5,2 a 3M, fez-se nova agitação em vórtex e centrifugou-se durante 5 minutos a 12.000 rpm. O precipitado foi descartado, foram adicionados 5 µL de ribonuclease A (RNase A) e os tubos foram incubados a 37 °C por 20 minutos. Após a incubação, adicionaram-se 200 µL de PCI (50mL de

fenol equilibrado, 50 mL de clorofórmio e 1,2 mL de álcool isoamílico), agitou-se em vórtex, centrifugou-se a 14.000 rpm por 5 minutos e o sobrenadante foi cuidadosamente transferido para um novo tubo. Em seguida o DNA foi precipitado pela adição de 900 µl de etanol absoluto gelado, e centrifugação por 5 minutos a 12.000 rpm. O precipitado foi lavado com etanol a 70%, secado a vácuo e ressuscitado com 30 µl de água ultra pura, tratada com DEPC. Os plasmídeos foram checados por eletroforese em gel de agarose a 0.7%, contrastados com Gel Red.

Para checar o tamanho do fragmento clonado, os plasmídeos foram digeridos com a enzima de restrição EcoRI, empregando-se 1µL do tampão da enzima 10x, 1 µL da enzima, 2 µL do plasmídeo purificado e 6 µL de água ultra pura, com posterior incubação a 37° C por 2 horas e checagem dos produtos por eletroforese em gel de agarose a 0,7%, empregando-se como controle os produtos originais da PCR com os fragmentos amplificados para cada vírus.

3.8 Sequenciamento e análise das sequências

Os plasmídeos foram sequenciados pela GeneWiz, Estados Unidos. As sequências recebidas foram montadas com o auxílio do programa DNA Baser Sequence Assembler v2 (DNABASER, 2010) e analisadas por intermédio da ferramenta BLAST, do NCBI, para verificar se a sequência do fragmento clonado estava correta.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Desenho dos primers

Com exceção dos vírus PYV e APLV, os oito demais vírus tinham a sequência de suas capas proteicas disponíveis no GenBank, de modo que os primers foram desenhados flanqueando as capas proteicas (Tabela 1). No caso dos outros dois vírus citados, os primers foram desenhados para amplificar o fragmento genômico cujas sequências estavam disponíveis no GenBank: para o APLV foram desenhados primers que amplificaram o final da proteína replicase e o início da proteína do capsídeo; no caso do PYV, apenas uma pequena parte da proteína replicase estava disponível.

Após a clonagem desses fragmentos, foram desenhados outros primers internos para serem empregados nos testes de diagnose por PCR ou RT-PCR, para amplificar um fragmento de, no máximo, 650pb (Tabela 1).

4.2 Amplificação dos fragmentos genômicos e clonagem nos plasmídeos

Os fragmentos genômicos dos dez vírus, contendo o tamanho discriminado na Tabela 1 foram amplificados por PCR e clonados nos plasmídeos. Após a clonagem, os plasmídeos foram multiplicados, purificados, e clivados com a enzima EcoRI. Nas Figuras 1 e 2 podem ser observadas as bandas obtidas em cada uma dessas etapas, checadas em gel de agarose.

Após essas operações, os plasmídeos foram enviados para sequenciamento, para comprovar a identidade do fragmento, o que foi feito por meio do programa BLAST do NCBI. As sequências obtidas se encontram no Anexo 1.

Todas elas, quando comparadas com as sequências disponíveis no GenBank apresentaram uma identidade entre 93 e 100%, confirmando que o isolado obtido pertencia realmente aos vírus quarentenários alvo, pois é bastante comum encontrar identidades de nucleotídeos entre isolados distintos variando entre 85 e 100% (GERALDINO et al., 2012; INOUE-NAGATA et al., 2001). Sabe-se que existe uma grande variabilidade entre isolados de uma mesma espécie de vírus, podendo inclusive haver recombinações entre estirpes, para gerar indivíduos com características biológicas distintas (GALVINO-COSTA et al., 2012; GERALDINO-DUARTE et al., 2012; HU et al., 2009; LORENZEN et al., 2006, 2008; NICOLAEVA et al., 2012; SINGH et al., 2008). Assim sendo, alguns critérios têm sido estabelecidos para se discriminar entre espécies de vírus. Para os Potyvirus, por exemplo, para que seja considerada uma nova espécie, existe a necessidade de haver uma identidade igual ou inferior a 77% (ADAMS; ANTONIW; FAUQUET, 2005). Desse modo, a identidade encontrada entre os fragmentos genômicos dos vírus clonados e os existentes no GenBank indica que os isolados virais empregados podem ser considerados representantes das espécies respectivas de vírus já descritos na literatura.

Tabela 1 Sequência dos primers desenhados para amplificação dos fragmentos destinados a clonagem em plasmídeos e dos primers a serem empregados nos métodos de diagnose por PCR e/ou RT-PCR

Fonte: UFL, Lavras, MG (2012)

Virus Quarentenário	Primer para amplificar o fragmento A ser clonado (F1 e R1) e para empregar na diagnose por RT-PCR (F2 e R2)	Tamanho do Fragmento amplificado
ACMV F1	ACMV178F: GGGCTTAGGTGTATGCTTGC	1044
ACMV R1	ACMV1221R:GTCTTTAGATACCAAGTA	
ACMV F2	ACMV367F: CAGCCCATACAGGAACCG	653
ACMV R2	ACMV1019R: CAGGATTGGAGGCATG	
APLV F1	APLV640F: TTCGCCAARCTCATG	1018
APLV R1	APLV1657R:CTYTGTTGTGCTARAGG	
APLV F2	APLV928F: GCCAGAGAGTTGCTAATCTCTC	511
APLV R2	APLV1438C-R: GARTTCATKGGRAGAGG	
BBrMV F1	BBrMV8695F:CAACAGCCCAAGCAC	875
BBrMV R1	BBrMV95569R: GAGAAGCTCACACTAC	
BBrMV F2	BBrMV8721: CCCACGACCACGTCAGCTCC	650
BBrMV R2	BBrMV9369R: GATCCACGAATAGCTGC	
BLMoV F1	BLMoV370F1: GAGGGCGACACTGCTT	1090
BLMoV R1	BLMoV1459R: GACCTGACTAACGGGCAC	
BLMoV F2	BLMoV551F : CTTTACCCGCCAGTGATG	446
BLMoV R2	BLMoV997R: CGCTGGAAGGGAGTCTG	
INSV F1	INSV2103CF: GTAAGCCCTTCTTG	805
INSV R1	INSV2907-R: CTACTTTAACCGCAAG	
INSV F2	INSV2127F: GCAGCAAGTCCTTTAGC	578
INSV R2	INSV2704R: CTTTACCAACAACCGTG	
PMTV F1	PMTV214-F: TGTGTTAGCGGTTTG	612
PMTV R1	PMTV825C-R: AACCCGTTACAGAGC	
PMTV F2	PMTV302F:CCACCCTTGAAATGGC	452
PMTV R2	PMTV753R: CGTCCACCTCTGCGAG	
PPV F1	PPV 8284F: GGGACAGATCAAATG	1160
PPV R1	PPV9443C-R: TCTCAATGCTGCTGC	
PPV F2	PPV9039C-F: CTTGGTATGAAGGAG	405
PPV R2	PPV9443 C-R: TCTCAATGCTGCTGC	
PVT F1	PVT5612F: CGTCAGTTAGGTCGGCGAG	890
PVT R1	PVT6501R: AGAACATCGGGGGGAGC	
PVT F2	PVT5734F: GCAGATAAGAGACGAAGTCC	414
PVT R2	PVT6147R: GCCCAAGTTGCATAGCCC	
PYV F1	PYV 1F: AAGTATTATTCAAAGTGC	255
PYV R1	PYV255R:GCAAAAACCTCCGAACAC	
PYV F2	PYV15F: GTGCGTCTTTGGACCCC	237
PYV R2	PYV251R:CCTCCGAACACTTCGCC	
TBSV F1	TBSV2510F:GGGATGAGCAACTGGC	954
TBSV R1	TBSV3463C-R:GTRTTBGTRGGTTGAGG	
TBSV F2	TBSV3030C1-F:ATTGTCGGCAATTTGTTAC	434
TBSV R2	TBSV3463R: GTRTTBGTRGGTTGAGG	

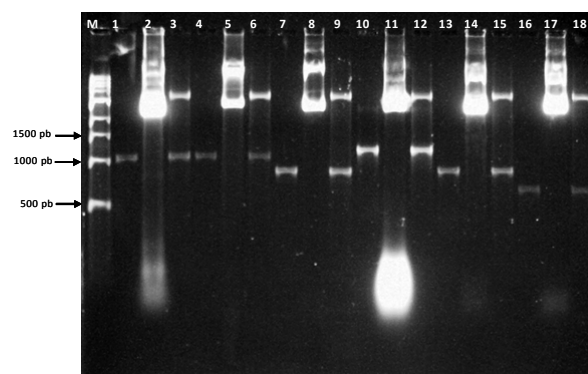


Figura 1 Análise eletroforética em gel de agarose dos produtos de PCR referentes aos fragmentos clonados, e a restrição com EcoRI dos plasmídeos para confirmação da clonagem. M = marcador 1kb, 1. ACMV (1044pb); 2. Plasmídeo com ACMV; 3. Restrição do plasmídeo com ACMV; 4. APLV (1018pb); 5. Plasmídeo com APLV; 6. Restrição do plasmídeo com APLV; 7. BBrMV (875pb); 8. plasmídeo com BBrMV; 9. Restrição do Plasmídeo com BBrMV; 10. BLMoV (1090pb); 11. Plasmídeo com BLMoV; 12. Restrição do Plasmídeo com BLMoV; 13. INSV (805pb); 14. Plasmídeos com INSV; 15. Restrição do plasmídeo com INSV; 16. PMTV (612pb); 17. Plasmídeo com PMTV; 18. Restrição do Plasmídeo com PMTV

Fonte: UFL, Lavras, MG (2012)

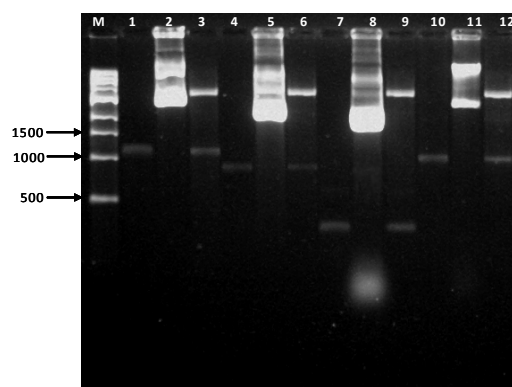


Figura 2 Análise eletroforética em gel de agarose dos produtos de PCR referentes aos fragmentos clonados, e a restrição com EcoRI dos plasmídeos para confirmação da clonagem. M. Marcador 1Kb; 1. PPV (1160pb); 2. Plasmídeo cm PPV; 3. Restrição do plasmídeo com PPV; 4. PVT (890pb); 5. Plasmídeo com PVT; 6. Restrição do plasmídeo com PVT; 7. PYV (255pb); 8. Plasmídeo com PYV; 9. Restrição do plasmídeo com PYV; 10. TBSV (954pb); Plasmídeo com TBSV; Restrição do plasmídeo com TBSV

Fonte: UFL, Lavras, MG (2012)

4.3 Utilização dos plasmídeos na diagnose por PCR e RT-PCR

O teste realizado com os primers internos comprovou a sua eficiência, pois cada um deles permitiu a amplificação do fragmento genômico do tamanho esperado. Na figura 3, podem ser observadas as bandas obtidas quando esses primers foram empregados, utilizando os plasmídeos com os fragmentos genômicos virais clonados.

Diversas técnicas podem ser empregadas para a diagnose de vírus em materiais vegetais. Uma das mais empregadas é a técnica sorológica DAS-ELISA, desenvolvida no final dos anos 70 (CLARK; ADAMS, 1977), que significou um grande avanço na diagnose de vírus em geral. Entretanto, em qualquer técnica de diagnose é fundamental que haja um controle positivo e um controle negativo, para que o resultado tenha a confiança desejada. Em se tratando de material importado, essa confiabilidade é ainda mais crítica, pois caso haja um resultado falso positivo ou falso negativo, as consequências serão sempre desastrosas para o país. No caso dos testes sorológicos para diagnose de vírus, o controle positivo deverá ser o próprio vírus, o que sempre pode significar um risco, caso ele não esteja inativo. Mas, mesmo inativo, haverá sempre a necessidade de se importar novos controles positivos, para o caso dos vírus quarentenários, que não existem no país.

Nesse contexto, a técnica PCR e RT-PCR oferecem diversas vantagens sobre a técnica sorológica ELISA, na diagnose dos vírus quarentenários. Em primeiro lugar, é uma técnica bem mais sensível que a DAS-ELISA, podendo detectar concentrações menores de vírus (ABDULAHÍ et al., 2001; BERNIAK; MALINOWSKI; KAMÍNSKA, 2009; FIGUEIRA; DOMIER; D'ARCY, 1997; SHANG et al., 2011). Além disso, permite que o controle positivo seja um fragmento do genoma viral como, por exemplo, o gene do capsídeo.

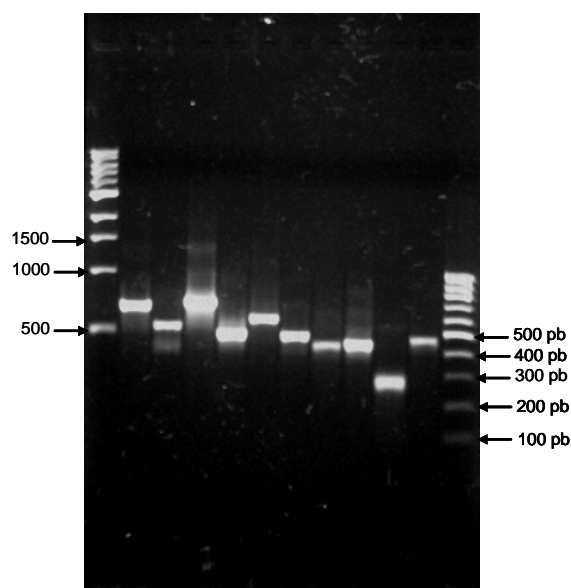


Figura 3 Análise eletroforética em gel de agarose dos fragmentos obtidos com os primers internos desenhados para utilização nas técnicas de diagnose via PCR e/ou RT-PCR. M. Marcador 1Kb; 2. ACMV (653pb); 3. APLV (511pb); 4. BBrMV (650pb); 5. BLMoV (446pb); 6. INSV (578pb); 7. PMTV (452pb); 8. PPV (405pb); 9. PVT (414pb); 10. PYV (237pb); 11. TBSV (434pb)
 Fonte: UFL, Lavras, MG (2012)

A capa proteica geralmente é altamente conservada dentro da espécie viral, de modo que o seu gene tem sido o fragmento genômico mais empregado para os testes de diagnose via PCR ou RT-PCR. (COX; JONES, 2010; GALVINO-COSTA et al., 2012; LORENZEN et al., 2008; MCDONALD et al., 1997; PUURAND; SAARMA, 1990; SALARI et al., 2011; SHUKLA; FRENKEI; WARD, 1991; SUDARSONO et al., 1993). Assim sendo, a utilização desse fragmento como controle positivo, além de permitir uma diagnose segura e confiável dos virus quarentenários, evitará a necessidade do uso do virion como controle positivo. Por outro lado, o plasmídeo com o

fragmento clonado pode ser facilmente multiplicado em células bacterianas competentes, sem a necessidade contínua de importação.

5 CONCLUSÃO

A utilização de fragmentos dos vírus *African cassava mosaic virus* (ACMV), *Andean potato latent virus* (APLV), *Banana bract mosaic virus* (BBrMV), *Blueberry leaf mottle virus* (BBLMV), *Impatiens necrotic spot virus* (INSV), *Plum pox virus* (PPV), *Potato mop-top virus* (PMTV), *Potato yellowing virus* (PYV), *Potato virus T* (PVT) e *Tomato bushy stunt virus* (TBSV), clonados em plasmídeo comercial para serem utilizados como controles positivos em testes de diagnose via RT-PCR e PCR, revelou-se eficiente, podendo esses plasmídeos serem multiplicados e armazenados indefinidamente, eliminando os possíveis riscos de introdução desses patógenos no país.

REFERÊNCIAS

- ABDULLAH, I. et al. Investigation on seed transmission of cucumber mosaic virus in cowpea. **African Crop Science Journal**, Dhaka, v. 9, n. 4, p. 677-684, 2001.
- ADAMS, M. J.; ANTONIW, J. F.; FAUQUET, C. M. Molecular criteria for genus and species discrimination within the family Potyviridae. **Archives of Virology**, New York, v. 150, n. 3, p. 459-479, July 2005.
- AFGC PROTOCOLS. **Trizol RNA isolation method**. Disponível em: <<http://www.arabidopsis.org/portals/masc/AFGC/RevisedAFGC/site2RnaL.htm#isolation>>. Acesso em: 16 ago. 2012.
- ALLEN, W. R. Occurrence and seed transmission of tomato bushy stunt virus in apple. **Canadian Journal of Plant Science**, Ottawa, v. 49, p. 797-799, 1969.
- ALLEN, W. R.; DAVIDSON, T. R. Tomato bushy stunt virus from *Prunus avium* L. I. **Field Studies and Virus Characterization**, Ottawa, v. 45, p. 2375-2383, 1967.
- ATANASOFF, D. Mosaic of stone fruits. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 8, p. 259-284, 1935.
- _____. Plum pox: a new virus disease. **Yearbook University of Sofia**, Sofia, v. 11, p. 49-69, 1932.
- BACHER, J. W. et al. Sequence analysis of the 3' termini of RNA1 of blueberry leaf mottle virus. **Virus Research**, Surrey, v. 33, p. 145-156, 1994.
- BERNIAK, H.; MALINOWSKI, T.; KAMIŃSKA, M. Comparison of ELISA and RT-PCR assays for detection and identification of Cucumber mosaic virus (CMV) isolates infecting horticultural crops in Poland. **Journal of Fruit and Ornamental Plant Research**, Skierniewice, v. 17, n. 2, p. 5-20, 2009.
- BJÖRNSTAD, A. Spredning av potet-mop-topp-virus (PMTV) med settepotater. **Jord og Avling**, Dahalsvei, v. 2, p. 2-4, 1969.
- BOL, J. F. Alfalfa mosaic virus and ilarviruses: involvement of coat protein in multiple steps of the replication cycle. **Journal of General Virology**, London, v. 80, p. 1089-1102, 1999.

BOL, J. F.; VLOTEN-DOTING, L. van; JASPARS, E. M. J. A functional equivalence of top component a RNA and coat protein in the initiation of infection by Alfalfa mosaic virus. **Virology**, Washington, v. 46, p. 73-85, 1971.

BORGES, M. de L.; SEQUEIRA, J. C.; LOURO, D. Appearance of tomato bushy stunt virus in Portugal: hosts, morphology and localization in *Capsicum annuum*. **Cells**, New York, v. 18, p. 118-122, 1979.

BRASIL. Controladoria Geral da União. **Execução orçamentária**: consulta por programa de governo. Brasília: MAPA, 2011. Disponível em: <<http://www3.transparencia.gov.br/TransparenciaPublica/jsp>>. Acesso em: 16 ago. 2012.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa nº 1**, de 15 de dezembro de 1998. Normas para Importação de Material Destinado a Pesquisa Científica. Brasília, 1998. Disponível em: <http://www.vertic.org/media/National%20Legislation/Brazil/BR_Instrucao_Normativa_MAA_1_1998.pdf>. Acesso em: 10 mar. 2012.

_____. **Instrução Normativa nº 41**, de 1 de julho de 2008. Altera os Anexos I e II da Instrução Normativa nº 52, de 20 de novembro de 2007. Brasília, 2008. Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=18888>>. Acesso em: 11 mar. 2012.

BREDERODE, F. T.; KOPER-ZWARTHOFF, E. C.; BOL, J. F. Complete nucleotide sequence of Alfalfa mosaic virus RNA 4. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 8, p. 2213-2223, 1980.

BRUNT, A. A. et al. **Plant viruses online**: descriptions and lists from the VIDE database version. Disponível em: <<http://biology.anu.edu/MES/vide/>>. Acesso em: 16 ago. 1996.

BULL, S. E. et al. Genetic diversity and phylogeography of cassava mosaic virus in Kenya. **Journal of General Virology**, London, v. 87, n. 10, p. 3053-3065, Oct. 2006.

CALVERT, E. L. The reaction of potato varieties to potato mop-top virus. In: _____. **Record of agricultural research**. Bangor: Ministry of Agriculture for North Ireland, 1968. p. 31-40.

CALVERT, E. L.; HARRISON, B. D. Potato mop-top, a soil-borne virus. **Plant Pathology**, Wageningen, v. 15, p. 134-139, 1966.

CAMBRA, M. et al. Plum pox virus and the estimated costs associated with sharka disease. **EPPO Bulletin**, Paris, v. 36, n. 2, p. 202-204, Apr. 2006.

CAVARARO, R. Produção agrícola municipal. **Boletim do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística**, Rio de Janeiro, n. 37, p. 1-91, 2012.

CHENG, X. F.; DONG, J. H.; ZHANG, Z. K. Molecular characterization of phalaenopsis isolate of impatiens necrotic spot virus from yunnan. **Journal of General Virology**, London, v. 78, p. 543-546, 2009.

CHENNA, R. Multiple sequence alignment with the Clustal series of programs. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 31, n. 13, p. 3497-3500, 2003.

CHERIAN, K. A. et al. Effect of banana bract mosaic disease on yield of commercial banana varieties in Kerala. **Proceedings of Global Conference on Banana and Plantain**, Bangalore, v. 155, p. 28-31, 2002.

CHERIF, C.; SPIRE, D.; HASNI, M. A. Identification du virus de rabougrissement buissonneux de la tomate (Tomato Bushy Stunt Virus) en Tunisie sur tomate, piment et aubergine: quelques caractéristiques de la souche tunisienne. **Agronomie**, Paris, v. 3, p. 701-706, 1983.

CHILDRESS, A. M.; RAMSDELL, D. C. Detection of blueberry leaf mottle virus in highbush blueberry pollen and seed. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 76, p. 1333-1337, 1987.

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

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

COX, B. A.; JONES, R. A. C. Genetic variability in the coat protein gene of Potato virus S isolates and distinguishing its biologically distinct strains. **Archives of Virology**, New York, v. 155, n. 7, p. 1163-1169, July 2010.

DAUGHTREY, M. et al. Tospoviruses strike the greenhouse industry: INSV has become a major pathogen on flower crops. **Plant Disease**, Quebec, v. 81, p. 1220-1230, 1997.

DNABASER sequence assembly software. Disponível em: <<http://www.dnabaser.com/index.html>>. Acesso em: 29 ago. 2012.

DUBERN, J. Quelques propriétés de la mosaïque Africaine du manioc I transmission. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 96, p. 25, 1979.

DUNEZ, J. **Plum pox disease of stone fruit trees**. Rome: FAO, 1987. 215 p.

ERNY, C. et al. An N-proximal sequence of the Alfalfa mosaic virus movement protein is necessary for association with cell walls in transgenic plants. **Journal of General Virology**, London, v. 73, p. 2115-2119, 1992.

FARGETTE, D. Molecular ecology and emergence of tropical plant viruses. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 44, p. 235-260, 2006.

FARGETTE, D.; THOUVENEL, J. C.; FAUQUET, C. Virus content of leaves of cassava infected by African cassava mosaic virus. **Annals of Applied Biology**, Warwickshire, v. 110, n. 1, p. 65-73, 1987.

FIGUEIRA, A. R.; DOMIER, L. L.; DARCY, C. J. Comparison of the techniques for detection of Barley Yellow Dwarf Virus- PAV-IL. **Plant Disease**, Quebec, v. 81, p. 1236-1240, 1997.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **Principles for responsible investment in agriculture to be developed**. Disponível em: <http://www.fao.org/index_en.htm>. Acesso em: 16 ago. 2012.

FOSTER, J. A. Regulatory actions to exclude pests during the international Exchange of plant germplasm. **Hortscience**, Alexandria, v. 23, n. 1, p. 60-66, 1988.

FUENTES, S.; JAYASINGHE, U. Potato yellowing, caused by a new bacilliform virus. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 28, p. 22-37, 1993.

GALVINO-COSTA, S. B. F. et al. A novel type of Potato virus Y recombinant genome, determined for the genetic strain PVYE. **Plant Pathology**, Wageningen, v. 61, n. 2, p. 388-398, Feb. 2012.

GERALDINO-DUARTE, P. S. et al. Complete genome sequence of the first Andean strain of potato virus S from Brazil and evidence of recombination between PVS strains. **Archives of Virology**, New York, v. 157, n. 7, p. 1357-1364, July 2012.

GERIK, J. S. et al. Etiology of tomato plant decline in the California desert. **Etiology**, San Francisco, v. 80, p. 1352-1356, 1990.

GIBBS, A. J.; HECHT-POINAR, E.; WOODS, R. D. Some properties of three related viruses: andean potato latent, Dulcamara Mottle, and Ononis Yellow Mosaic, Great Britain. **Journal of General Microbiology**, London, v. 44, p. 177-193, 1966.

GILLET, J. M. et al. A comparison between the relative abilities of ELISA, RIA and ISEM to detect blueberry shoestring virus in its aphid vector. **Acta Horticulturae**, The Hague, v. 129, p. 25-29, 1982.

GIMENES, M. A. **Bancos ativos de germoplasmas de espécies industriais**. Brasília: EMBRAPA, 2003. Disponível em: <<http://plataformarg.cenargen.embrapa.br/rede-vegetal/projetos-compoentes/pc10-bancos-atvivos-de-germoplasma-de-especies-industriais>>. Acesso em: 29 ago. 2012.

_____. **Conservação de germoplasmas vegetal**. Brasília: EMBRAPA, 2012. Disponível em: <http://www.cenargen.embrapa.br/_tt/tt04_02conservacao.html>. Acesso em: 29 ago. 2012.

GOUD, A. R.; SYMONS, R. H. Alfafa mosaic virus RNA: determination of the sequence homology between the four RNA species and a comparison with the four RNA species of cucumber mosaic virus. **European Journal Biochemistry**, Berlin, v. 91, p. 269-278, 1978.

GUNN, M. R.; SYMONS, R. H. Sequence homology at the 3' termini of the four RNAs of Alfalfa mosaic virus. **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 109, p. 145-150, 1980.

HA, A. N. et al. Tomato spotted wilt virus L RNA encodes a putative RNA polymerase. **Journal of General Virology**, London, v. 72, p. 2207-2216, 1991.

HA, C. et al. Design and application of two novel degenerate primer pairs for the detection and complete genomic characterization of potyviruses. **Archives of Virology**, New York, v. 153, n. 1, p. 25-36, 2008.

HARRISON, B. D. **Potato mop-top virus**. Kew: CMI/AAB, 1974. 138 p. (CMI/AAB Description of Plant Viruses).

HARRISON, B. D.; JONES, R. A. C. Host range and some properties of potato mop-top virus. **Annals of Applied Biology**, Warwick, v. 65, p. 393-402, 1970.

HARRISON, B. D.; MURANT, A. F. **Nepovirus group**. Kew: CMI/AAB, 1977. 185 p. (CMI/AAB Descriptions of Plant Viruses).

HAUSBECK, M. K. et al. Tomato spotted wilt virus survey among greenhouse ornamentals in Pennsylvania. **Plant Disease**, Quebec, v. 76, p. 795-800, 1992.

HERNÁNDEZ, A. J. Plum pox virus (PPV) infection produces an imbalance on the antioxidative systems in Prunus species. **Acta Phytopathologica et Entomologica Hungarica**, Budapest, v. 42, p. 209-221, Nov./Dec. 2007.

HINOSTROZA, A. M.; FRENCH, E. R. Potato mop-top virus in cork-diseased Peruvian potatoes. **American Potato Journal**, Orono, v. 49, p. 234-239, 1972.

HU, X. et al. A novel recombinant strain of *Potato virus Y* suggest a new viral genetic determinant of vein necrosis in tobacco. **Virus Research**, Amsterdam, v. 143, n. 1, p. 68-76, Jan. 2009.

IMOTO, M. et al. Occurrence of potato mop-top virus in Japan. **Annals of the Phytopathological**, Tokyo, v. 47, p. 409-412, 1981.

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

JONES, R. A. C. Tests for transmission of four potato viruses through potato true seed. **Annals of Applied Biology**, Warwick, v. 100, p. 315-320, 1982.

JONES, R. A. C.; FRIBOURG, C. E. Symptoms induced by Andean potato latent virus in wild and cultivated potatoes. **Potato Research**, Wageningen, v. 21, p. 121-127, 1978.

KASHIWAZAKI, S. et al. Sequence analysis and gene content of Potato mop-top virus RNA3: further evidence of heterogeneity in the genome organization of furovirus. **Virology**, Washington, v. 206, p. 701-706, 1995.

KEGLER, H. et al. **Plant viroses online**: descriptions and lists from the VIDE Database. Version 16. Canberra, 1997. Disponível em: <http://biology.anu.edu.au/Groups/MES/vibe/>. Acesso em: 16 ago. 2012.

KOENIG, R.; FRIBOURG, C. E.; JONES, R. A. C. Symptomatology, serological, and electrophoretic diversity of isolates of Andean potato latent virus from different regions of the Andes. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 69, p. 748-752, 1979.

KOENIG, R.; KUNZE, L. Identification of tombusvirus isolates from cherry in southern Germany as petunia asteroid mosaic virus. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 103, p. 361-368, 1982.

KOPER-ZWARTHOFF, E. C. et al. Nucleotide sequence of the 3'-noncoding region of alfalfa mosaic virus RNA 4 and its homology with the genomic RNAs. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 7, n. 7, p. 1887-1900, 1979.

KRCZAL, G.; BEUTEL, M. A new soilborne virus disease in statice (*Gonolium tartaricum*). **Acta Horticulturae**, The Hague, v. 377, p. 115-122, 1994.

KUNZE, L.; KRCZAL, H. Transmission of sharla virus by aphids. In: EUROPEAN SYMPOSIUM ON FRUIT TREE VIRUS DISEASES, 8., 1971, Paris. **Proceedings...** Paris: INRA, 1971. p. 255-260.

LATVALA-KILBY, S. et al. Detection of Potato mop-top virus in potato tubers and sprouts: combinations of RNA2 and RNA3 variants and incidence of symptomless infections. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 99, n. 5, p. 519-531, May 2009.

LAW, M. D.; MOYER, J. W. A tomato spotted wilt-like virus with a serologically distinct N protein. **Journal of General Virology**, London, v. 71, p. 933-938, 1990.

LAW, M. D.; SPECK, J.; MOYER, J. W. The nucleotide sequence and genomic organization of the impatiens necrotic spot tospovirus M RNA. **Virology**, Washington, v. 188, p. 732-741, 1992.

LECLANT, F. Aspect sérologique de la transmission de la shark (plum pox) dans le Sud-Est de la France, Mise em evidence de nouvelles espèces d'aphides. **Annales de Phytopathologie**, Paris, v. 4, p. 431-439, 1973.

LEGG, J. P.; FAUQUET, C. M. Cassava mosaic geminiviruses in Africa. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 56, n. 4, p. 585-599, Nov. 2004.

LORENZEN, J. H. et al. NE-11 represents a new strain variant class of Potato virus Y. **Archives of Virology**, New York, v. 153, n. 3, p. 517-525, 2008.

_____. Whole genome characterization of *Potato virus Y* isolates collected in the western USA and their comparison to isolates from Europe and Canada. **Archives of Virology**, New York, v. 151, n. 6, p. 1055-1074, Dec. 2006.

LUIZ-ARTEAGA, M. et al. Different tomato bushy stunt virus strains that cause disease outbreaks in solanaceous crops in Spain. **Etiology**, San Francisco, v. 86, n. 5, p. 535-542, 1996.

MAEJIMA, K. et al. First report of plum pox virus infecting Japanese apricot (*Prunus mume* Sieb. Et Zucc.) in Japan. **Journal of General Plant Pathology**, Tokyo, v. 76, n. 3, p. 229-231, Mar. 2010.

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

MARINHO, V. L. de A. et al. Importância da quarentena no controle de doenças transmitidas por sementes de hortaliças. In: ENCONTRO SOBRE PRODUÇÃO E QUALIDADE DE SEMENTES DE HORTALIÇAS, 1., 1991, Brasília. **Anais...** Brasília: EMBRAPA-CNPQ, 1991. p. 107-112.

_____. Indexação do banco de germoplasma de batata "in vitro" do Cenargen, quanto á presença de vírus e viroides. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 18, p. 290, 1993. Resumo. Suplemento.

MARTELLI, G. P.; GALLITELLI, D.; RUSSO, M. Tombusviruses. **The Plant Viruses**, New York, v. 3, p. 13-72, 1988.

MARTINEZ, J. A.; GALINDO, J. A.; RODRIGUEZ, R. M. Estudio sobre la enfermedad del 'Pinto' del jitomate (*Lycopersicon sculentum* Mill) en la region de Actopan, HGO. **Agrociencia**, Montevideo, v. 18, p. 71-78, 1974.

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

MIRANDA, J. E. C. **Princesa**: cv. de batata doce resistente ao "Mal-do-pé". Brasília: EMBRAPA-CNPq, 1989. 3 p.

MØLGAARD, J. P.; NIELSEN, S. L. Influence of post harvest temperature treatment, storage period and harvest date on development of spraing caused by tobacco rattle virus and potato mop-top virus. **Potato Research**, Wageningen, v. 39, p. 571-579, 1996.

MONACO, L. C. **Consecuencias de la introducción de la roya del cafeto em Brasil**. Turrialba: IICA-PROMECAFE, 1978. 27 p.

MONTERO-ASTUA, M. et al. Incidence, distribution and association of *Spongospora subterranea* and Potato mop-top virus in Costa Rica. **Plant Disease**, Quebec, v. 92, p. 1171-1176, 2008.

NAKAYAMA, T. et al. Diagnosis of Potato mop-top virus in soil using bait plant bioassay and RT-PCR-microplate hybridization. **American Journal of Potato Research**, Orono, v. 87, n. 2, p. 218-225, Mar. 2010.

NASCIMENTO, K. L.; NASCIMENTO, C. A.; CARDOZO, S. A. A dependência crescente do agronegócio para os saldos de comércio exterior brasileiro, 1998 a 2007. In: CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ECONOMIA, ADMINISTRAÇÃO E SOCIOLOGIA RURAL, 46., 2008, Rio Branco. **Anais...** Rio Branco: UFAM, 2008. p. 1-21.

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. **Basic Local Alignment Search Tool - BLAST**. Disponível em: <<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>>. Acesso em: 16 ago. 2012.

NEMET, M.; KOLBER, M. Additional evidence on seed transmission of Plum pox virus in apricot, peach and plum, proved by ELISA. **Acta Horticulturae**, The Hague, v. 130, p. 293-300, 1983.

NEMETH, M. **Virus, mycoplasma and rickettsia diseases of fruit trees**. Dordrecht: M. Nijhoff, 1986. 132 p.

NIELSEN, S. L.; ENGSBRO, B. Susceptibility of potato cultivars to spraing caused by primary infection of tobacco rattle virus and potato mop-top virus. **Danish Journal of Plant and Soil Science**, Copenhagen, v. 96, p. 507-516, 1992.

NIELSEN, S. L.; MØLGAARD, J. P. Incidence, appearance and development of potato mop-top furovirus-induced spraing in potato cultivars and the influence on yield, distribution in Denmark and detection of the virus in tubers by ELISA. **Potato Research**, Wageningen, v. 40, n. 1, p. 101-110, Feb. 1997.

NIKOLAEVA, O. V. et al. Epitope mapping for monoclonal antibodies recognizing tuber necrotic isolates of potato virus Y. **American Journal Potato Research**, Orono, v. 89, n. 2, p. 121-128, Feb. 2012.

OLIVEIRA, M. R. V. et al. **Quarentena vegetal no Brasil**: aspectos gerais com ênfase em insetos e ácaros. Disponível em: <<http://www.portaldoagronegocio.com.br/conteudo.php?id=22821>>. Acesso em: 20 ago. 2012.

OSTER, S. K.; WU, B.; WHITE, K. A. Uncoupled expression of p33 and p92 permits amplification of tomato bushy stunt virus RNAs. **Journal of Virology**, Washington, v. 72, p. 5845-5851, 1998.

PATIL, B. L. et al. Deletion and recombination events between the DNA-A and DNA-B components of Indian cassava-infecting geminiviruses generate defective molecules in *Nicotiana benthamiana*. **Virus Research**, Amsterdam, v. 124, n. 1, p. 59-67, 2007.

PATIL, B. L.; FAUQUET, C. M. Cassava mosaic geminiviruses: actual knowledge and perspectives. **Molecular Plant Pathology**, London, v. 10, n. 3, p. 685-701, June 2009.

PERIN, E. et al. **Referências modulares para a produção de frutas de caroço na região sudoeste do Paraná**. Curitiba: SEAB, 2009. Disponível em:

<http://www.iapar.br/arquivos/File/zip_pdf/redreferencia/pp_modsudoestefruta.pdf>. Acesso em: 16 set. 2012.

PUURAND, U.; SAARMA, M. Cloning and Sequencing of the 3'-terminal region of potato virus Y^N (rusian isolate) RNA genomic. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 18, n. 22, p. 6694-6699, 1990.

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

RAMSDELL, D. C.; STACE-SMITH, R. Blueberry leaf mottle, a new disease of highbush blueberry. **Acta Horticulturae**, The Hague, v. 95, p. 37-48, 1980.

_____. Blueberry leaf mottle virus, descriptions of plant virus commune. **Applied Biologys**, Surrey, v. 267, p. 37-45, 1983.

_____. Physical and chemical properties of the particles of ribonucleic acid of blueberry leaf mottle virus. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 71, n. 4, p. 468-472, 1981.

RIBEIRO, S. R. P. **Caracterização de isolados de *Potato virus S* (PVS) no Brasil e seu efeito na produção de batata**. 2007. 108 p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2007.

RISH, N. Significant plant virus diseases in India and a glimpse of modern disease management technology. **Journal of General Plant Patology**, Tokyo, v. 75, n. 1, p. 1-18, Jan. 2009.

RIVERA, R.; RAMIREZ, P.; PEREIRA, R. Preliminary characterization of viroses infecting banana in Costa Rica. In: WORKSHOP OF BIOTECHNOLOGY APPLICATIONS FOR BANANA AND PLANTAIN IMPROVEMENT, 1., 1993, San Jose. **Proceedings...** San Jose: International Network for the Improvement of Banana and Plantain, 1993. p. 63-68.

RODONI, B. C. Identification and characterisation of banana bract mosaic virus in India. **Plant Disease**, Quebec, v. 81, n. 3, p. 669-672, Mar. 1997.

RODONI, B. C.; DALE, J. L.; HARDING, R. M. Characterization and expression of the coat protein-coding region of banana bract mosaic potyvirus, development of diagnostic assays and detection of the virus in banana plants from five countries in southeast Asia. **Archives of Virology**, New York, v. 144, n. 9, p. 1725-1737, 1999.

ROJAS, M. R. et al. Exploiting chinks in the plant's armor: evolution and emergence of geminiviruses. **Annual Reviews Phytopathology**, Palo Alto, v. 43, p. 361-394, 2005.

ROPEROS, N. I.; MAGNAYE, L. V. Status of banana diseases in Asia and the Pacific. In: VALMAYOR, R. (Ed.). **International network for the improvement of banana**. Brisbane: Freeman, 1991. p. 52-66.

ROY, A. S.; SMITH, I. M. Plum pox situation in Europe. **EPP0 Bulletin**, Paris, v. 24, p. 515-523, 1994.

RUBINO, L. et al. Tepovirus, a novel genus in the family Betaflexiviri. **Archives of Virology**, New York, v. 10, n. 1, p. 10-17, Jan. 2012.

RUSSO, M. et al. The complete nucleotide sequence of potato virus T. **Archives of Virology**, New York, v. 154, n. 2, p. 321-325, 2009.

SAKURAI, T.; INOUE, T.; TSUDA, S. Distinct efficiencies of impatiens necrotic spot virus transmission by five thrips vector species (Thysanoptera: Thripidae) of tospoviruses in Japan. **Applied Entomology and Zoology**, Tokyo, v. 39, n. 1, p. 71-78, Jan. 2004.

SALARI, K. et al. Analysis of Iranian Potato virus S isolates. **Virus Genes**, Norwell, v. 43, n. 2, p. 281-288, Oct. 2011.

SALAZAR, L. F.; HARRISON, B. D. Host range, purification and properties of potato virus T. **Annals of Applied Biology**, Warwick, v. 89, p. 223-235, 1978.

_____. Previously undescribed potato viruses from South America. **Nature**, London, v. 265, p. 337-338, 1977a.

_____. Two previously undescribed potato viruses from South America. **Nature**, London, v. 265, p. 337-338, 1977b.

SANDGREN, M. Potato mop-top virus (PMTV): distribution in Sweden, development of symptoms during storage and cultivar trials in field and glasshouse. **Potato Research**, Wageningen, v. 38, p. 379-389, 1995.

SANDGREN, M. et al. The readthrough region of potato mop-top virus (PMTV) coat protein encoding RNA, the second largest RNA of PMTV genome, undergoes structural changes in naturally infected and experimentally inoculated plants. **Archives of Virology**, New York, v. 146, n. 3, p. 467-477, 2001.

SAVENKOV, E. I.; SANDGREN, M.; VALKONEN, J. P. T. Complete sequence of RNA 1 and presence of tRNA-like structures in all RNAs of Potato mop-top pomovirus. **Journal of General Virology**, London, v. 80, p. 2779-2784, 1999.

SCHOLTHOF, K. B.; SCHOLTHOF, H. B.; JACKSON, A. O. The tomato bushy stunt virus replicase proteins are coordinately expressed and membrane associated. **Virology**, Washington, v. 208, p. 365-369, 1995.

SCHROEDER, M.; WEIDEMANN, H. L. Detection of quarantine viruses of potato by ELISA. **EPPO Bulletin**, Paris, v. 20, p. 581-590, 1990.

SCOTT, K. P. et al. The nucleotide sequence of Potato mop-top virus RNA 2: a novel type of genome organization for a furovirus. **Journal of General Virology**, London, v. 75, p. 3561-3568, 1994.

SELVARAJAN, R.; JEYABASKARAN, K. J. Effect of Banana bract mosaicvirus (BBrMV) on growth and yield of cultivar Nendran (plantain, AAB). **Indian Phytopathology**, Lucknow, v. 59, n. 4, p. 496-500, Dec. 2006.

SERÇE, Ç. U. et al. Further characterization of a new recombinant group of Plum pox virus isolates, PPV-T, found in orchards in the Ankara province of Turkey. **Virus Research**, Amsterdam, v. 142, n. 1/2, p. 121-126, June 2009.

SHANG, H. et al. Monoclonal antibody-based serological methods for detection of Cucumber green mottle mosaic virus. **Virology Journal**, London, v. 8, n. 228, p. 1-7, 2011.

SHUKLA, D. D.; FRENKEI, M. J.; WARD, C. W. Structure and function of the potyvirus genome with special reference to the coat protein coding region. **Canadian Journal of Plant Pathology**, Ontario, v. 13, n. 2, p. 178-191, Feb. 1991.

SILVESTRE, R.; UNTIVEROS, M.; CUELLAR, W. J. First report of potato yellowing virus (*Genus Ilarvirus*) in *Solanum phureja* from Ecuador. **Plant Disease**, Quebec, v. 95, n. 2, p. 355-368, Feb. 2011.

SINGH, R. P. et al. Discussion paper: the naming of potato virus Y strains infecting potato. **Archives of Virology**, New York, v. 153, n. 1, p. 1-13, 2008.

STOREY, H. H.; NICHOLS, R. F. W. Studies on the mosaic of cassava. **Annals of Applied Biology**, Warwick, v. 25, p. 790-806, 1938.

STUSSI-GARAUD, C. In situ location of an Alfalfa mosaic virus non-structural protein in plant cell walls: correlation with virus transport. **Journal of General Virology**, London, v. 68, p. 1779-1784, 1987.

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

TENLLADO, F.; BOL, J. F. Genetic detection of the multiple functions of Alfalfa mosaic virus coat protein in viral RNA replication, encapsidation, and movement. **Virology**, Washington, v. 268, p. 29-40, 2000.

THAKUR, P. O. et al. Plum pox virus on stone fruits from India: a new record. **Plant Disease**, Quebec, v. 9, n. 1, p. 100-102, Jan. 1994.

THOMAS, J. E.; MAGNAYE, L. V. Banana bract mosaic disease: musa disease fact sheet. In: INTERNATIONAL NETWORK FOR THE IMPROVEMENT OF BANANA AND PLANTAIN, 1., 1996, Montpéllier. **Proceedings...** Montpéllier: INIBP, 1996. p. 1.

TIENDÉBÉOGO, F. et al. Evolution of African cassava mosaic virus by recombination between bipartite and monopartite begomoviruses. **Virology Journal**, London, v. 9, n. 1, p. 9-21, Jan. 2012.

TODD, J. M. Soil-borne virus diseases of potato. **Scottish Plant Breeding Station Record**, Edinburgh, v. 25, p. 209-235, 1965.

TORRANCE, L. Serological methods to detect plant viruses: production and use of monoclonal antibodies. In: _____. **Techniques for the rapid detection of plant pathogens**. Oxford: Blackwell Scientific, 1992. p. 7-33.

ULLMAN, D. E. et al. Thrips as vectors of tospoviruses. **Advances in Botanical Research**, New York, v. 36, n. 1, p. 113-140, Mar. 2002.

VALKONEN, J. P. T. et al. Naturally occurring viral infections in *Solanum brevidens* and *S. fernandezianum*. **Potato Research**, Wageningen, v. 35, p. 411-417, 1992.

VERNON-SHIRLEY, M. L. et al. A simple assay system incorporating monoclonal antibodies for the detection of potato virus T. **Potato Research**, Wageningen, v. 36, n. 1, p. 83-88, Apr. 1993.

VOSSSEN, E. A. G. van der; NEELEMAN, L.; BOL, J. F. Early and late functions of Alfalfa mosaic virus coat protein can be mutated separately. **Virology**, Washington, v. 202, p. 891-890, 1994.

WARBURG, O. Mitt Deutch. **Schutzgeb**, Berlin, v. 7, p. 131, 1894.

WIJKAMP, I.; PETERS, D. Determination of the median latent period of two tospoviruses in *Frankliniella occidentalis*, using a novel leaf disk assay. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 83, p. 986-991, 1993.

ZHANG, G.; SLOWINSKI, V.; WHITE, K. A. Subgenomic mRNA regulation by a distal RNA element in a (+)-strand RNA virus. **RNA**, Cambridge, v. 5, p. 550-561, 1999.

ZHOU, C.; YANG, Y.; JONG, A. Y. Mini-prep in ten minutes. **Biotechniques**, Natick, v. 8, n. 2, p. 172-173, 1990.

ZIMMERMANN, A. Die krauselkrankheit des maniok. **Pflanzer**, Baltimore, v. 2, p. 145, 1906.

ANEXO

1. Sequência dos Fragmentos genômicos, pertencentes aos dez virus indicados, clonados com a finalidade de servirem como controle positivo.

1.1 ACMV

GGGCTTAGGTGTATGCTTGCAATTAAATATTTGCAGGCCTTAGAGGATACATACGAGCC
 CAGTACTTTGGGCCACGATCTGGTTAGAGATCTAATCTCAGTTATCAGGGCTCGTAATT
 ATGTGGAAGCGACCAGGAGATATCATCATTTCCACTCCAGGCTCGAAGGTTTCGTGGAAG
 GCTGAACTTCGACAGCCCATACAGGAACCGTGCTACTGCCCCACTGTCCACGTCACAA
 ATCGAAAACGGGCTGGATGAACAGGCCCATGTACAGAAAGCCCATGATGTACAGGATG
 TATAGAAGCCCAGACATACCTAGAGGCTGTGAAGGCCCATGTAAGGTCCAGTCGTTTGA
 GCAGAGGGATGATGTGAAGCACCTTGGTATCTGTAAGGTGATTAGTGATGTGACACGTG
 GGCTGGGCTGACACACAGAGTCGGAAAAGAGGTTTTGTATCAAGTCCATTTACATTCCTT
 GGTAAGATCTGGATGGATGAAAATATTAAGAAGCAGAATCACACGAATAATGTGATGTT
 TTACCTGCTTAGGGATAGAAGGCCTTATGGCAATACGCCCCAAGACTTTGGGCAGATAT
 TTAACATGTTTTGATAATGAGCCAGTACTGCAACAATCGAGAACGATTTGAGGGATAGG
 TTTTCAGGTGTTGAGGAAATTCATGCCACTGTTATTGGTGGTCCATCTGGCATGAAGGA
 GCAGGCGTTGGTGAAGGTTTTACAGGTTGAATCATCACGTGACATACAATCATCAGG
 AGGCAGGGAAGTACGAGAATCACACAGAGAATGCTTTGCTTTTGTACATGGCATGTACT
 CATGCCCTCCAATCCTGTATATGCTACGTTGAAAATACGTATATACTTCTATGACAGTAT
 TGGCAATTAATAAACATTGAATTTTATTTTCATGAGTCAACTGACACTCAATAGTTTTTT
 CAATTACATTGAACAAAACATGACAAGCAGCTCTAATTACATCGTTAATTGAGATAACA
 CCTATATTATCCAAGTATTTAAGTACTTGGTATCTAAAGAC

1.2 APLV

TTGCGCAAGCTCATGATCTGCGTTGATGATGGAAGCCTTGAGGACAAAAAAGTCTTTA
 CTTGTCTGAATTCTCAGTAGGTCATCTCTCCGGCGACTGCATCCAAGCCATCTTACCTC
 CATCGCTCATCAAGTATCAGTCAGCATGTGACTTCTTCTGCCACAATTGCACCCCA
 TCCCAAAAATCCTTCTCAGCCTGGATCCCATCCCTGAGAACAAGATCCTTCAACTCCT
 CCTCAAAGTTGTTGGGCTTCACAGGCCTTCTTTTCTTACCTTCCCCAAAAGCCAGAG
 AGTTGCTAATCTCTCGCTCCAGCCTTCCCTTCCCTTCACTCTGATCCCAAAATCTCCCTA
 CTAGAGTCTGAATTGCTTCCCTTTTTCAATTAATTATGGAAGATCAGACTCCTGCCGTT
 TCTAAACAGCCCTCCATTAATGCTCCCGGATACAATCTCCACCTCCTGGCTCTCAACT
 CTCTTCTCTTTTGGAGCTGCCTTTTTCAGTTCCAGGCTACCACCTTCGGCGCTGCCGAGA
 CAGCTGCTCAAGTTAGTCTCTCCTCTTCCACCGTGATCTCCACCATTGCAAAGAAGTTT
 CGGCATGCTAAGCTCATTCAATGCCACGCCATCATCACTCCCACCTACTTGGCCATAGC
 CAATCCCATCACCATCAACCTCGTCTGGGTCCCTGACAGCTCCACCGCAAAGCCCAGCG

AGATACTCAATGTCTATGGCGGCACTTCTTTCACTTTTGGCGGTGCCTTTTGCTCCACC
 AAATCCATCATTGTTCCCTCTCCCATGAACTCCGTTAACCTCATGCTCAAGGACAGTGC
 CCTCTACACCGACGGCCCTAAGCTCCTTGCATATTCTCCTGCCCCAGCCACTCCTTCCA
 AATCTCCAGTGGGCACTATTCAAATCTCAGGCAAGATTCTCTTGTCTTCTCCTCTTCTC
 CAAGCCTCTTAAACCCCTGCATCCTCCATCTCCTATGGTAATTGTGGACAGTTCACCTC
 CCTCTAGCACACAGAG

1.3 BBrMV

CAACAGCCCCAAGCACATTTGGACAACCCACGACCACGTCAGCTCCATCTTCATCAAGC
 ACGCCACCCAGAGCCTCCACACAAATTGCGCCAATTCGGGATCGTGACGTTGATGCTGG
 TAGTACAAATTTTATTATCCCTCGAATTAACCGATGACAGGGAAAATGCGTCTCCCAA
 GGTATCGAGGAAAACTGCAATTAACGTGAGTTCCTTGCTTCAATACAAGCCTGATCAG
 TTTGATTTGTCAAACGCCATCGCAACTAGGGAGCAATATGATGCATGGTGTGATGCTGT
 AAAACGTGAGTATGCCATAGAGGACGAAGAACAGTTCACAACCTTTGTTAGGTGGTTTGA
 TGGTGTGGTGCATAGAGAATGGGACATCACCAAATTTAAATGGTACATGGAGTATGATG
 GACAAGGGTGAGCAACTAGTCTACCAGTTAAAGCCCATTATTGAGAACGCTCAGCCTAC
 TTTTCGGCAAATTTATGGCACATTTTCTGATGCCGCTGAGGCATACATAACAATGCGTA
 ATGTACGAGAGATATATGCCTAGGTGGGGAGCACTTAGAGGATTGAATGACATAAGC
 TTAGCCCGATATGCATTTGATTTTACGTAGTCACATCAAAAACCTACGAACAGGGCTAG
 AGAAGCACACACGCAGATGAAAGCTGCAGCTATTCGTGGATCAAACACTCGGCTATTTG
 GTTTGGATGGAAATCTTGGACCTGGTGAAGAGAATACAGAGAGGCATACTGTTGAAGAT
 GTGAAGCGTGATATGCACTCTCTGCTTGGGATGAAACATGAATAAATGAATAGTTATCT
 GGAGCTTGCTCCCTATAAATTATGTGTGCTTTATGATATTGTGATAAATTGTAGTGTGAGC
 TTCTC

1.4 BLMoV

GAGGGCGACACTGCTTTACCTATAGAGGTATGCAACCAATTGCCCAATTTTGTGTTGCC
 AATATCGGAGAAGAGTGTCTTCGAGTTTGATTTAGATATGTCCCTTGCGGGATATAACC
 TTTTCAAACCTCTAAAGGCTTCGCTGATCCGGTATTATTAGTGTACATAATAGATACT
 AATCTTTTACCCGCCAGTGATGAATGGGTTTACACATGTGAGGTTTGTATAAAATCTGC
 CTTACATGCCACTTCTGTGGCAAATAAACCCATTCTATCGCTACCACATTCTTTTGACG
 GTCGTCTCCCACTTGACTTGTGGAGGGGACCTTTTTCTTTTGAGTTAGGTAGAAGTTCC
 AAAAGGGAGCATCACATCGGCATCAATTTTGGTAGTGCTCGTGTGTTTCCGGGACCAA
 TACCTTTTATTCTTTTCTGCTGCCTATACTCAGCTTTTGCAGAGTGTAGGTGGTATTT
 TACATGGTACTGTCGTTCAAACCTGGCAGTAGGGCTATATCTTGTGAGATGTTTCTTATC
 CTTCAACCGGATAAGACCGCCACAATTTAGAGCAGGCTCTCCGCCCTTCTGTTGTGCG
 TATAACCAACTGGGGTGGACCATTTTCCATTTCGTATACAGACTCCCTTCCAGCGAGAGC
 AGATTTTTAATACCGCGTTCAGCTGGTAATCTATGCTATTGGGGTCCCTATGGGAGCA
 CAAGCTATATCTGCACCATATCAATATATGGTGCATTTCTCCCATATAACAAGAAGAGGG
 GGATCCTCCGCCTCGTCCATTTGGCAATGTGTTGCTCTTTAACTGGGCCACCATTTCCG

AAATGACGAATCTTACCCGGTTTCAGATTCCGGCGCGACTAAGCGATCTCGTGTGGCCA
 GGTCAAACGTGCACCATGAGGCGAAATGCTTTAGCGAATCTGATAGGGTCTTGTGGGTT
 CTTCCGGGGCCGTGTACATTTGTGTTCCAATGGACATTGAATGTAGCACATATTGTAC
 CAACTGCTACAATGCAAAATTTAACGGCAGTTGGGCGGTTGGCAATGCGGAGACTAAT
 GGTTCACAAATCCTACAAAGTTGGATTGTGCCCGTTAGTCAGGTC

1.5 INSV

GTAAGCCCTTCTTTGTAGTGGTCCATTGCAGCAAGTCCTTTAGCTTTCCGGACTACAAGC
 CTTTAGTATATCTGCATATTGTTTAGCCTTGCCAATTTCAACAGAGTTCATGCTATATC
 CTTTGCTTTTTAGAACTGTGCACACTTTCCCAACTGCCTCTTTAGTGCTAAACTTAGAC
 ATGTCAATTTCAAGCTCAACATGTTTAGCATCTTGATAAATAGCCAGAACTAGTGCAGC
 TATTTCAAATTCAGTACAGATGCTATCAGAGGAAGACTTCCTCCTAAGAGAACACCCA
 AGACACAGGATTTCAAATCTGTGGTTGCAAGACCATATGAGGCAATCAGAGGGTGACTT
 GGAAGGCTATTTATAGCTTCAGTCAGAGCAGATCCATTGTCCTTTATCATTCCAACAAG
 ATGAACTCTCACCATTGCATCAAGTCTTCGAAAAGTCATATCATTGACCCCAACTCTTT
 CTGAATTGTTTCTAGTTTCTTAATTGTGACTGATCCAAAAGTGAAGTCAGCACTCTTA
 ATGACTCTCATTATAGATTGCCATTCTTGAGGAAGGATAGGCAAGATGCAGTAGTCAT
 GTTCTGAATCTTTCCACGGTTGTTGGTAAAGAAGTCAGTGAAATTGAAAGACCCCTTCAT
 TTTGAGTTTCCCAAATTTAAGGAATCAGATTGAGTCAAAGCTTGACTATGTTCTCC
 TTGGTAATCTTTGCTTTGTTTCATCTTGATCTGCTGACTTTACTAACTTTAAAGCTTAAA
 GTGTTCAAATTAATAAATAGTACTTGCGGTTAAAGTAG

1.6 PMTV

GGGAATTCGATTTGTGTTAGCGGTTTGAAAATTTTATTTTCTTACTGTGTTTGTGTTTC
 TATAATTTCTCGGAGATCTGGAATCAGAGGAGGTTTGTGTTACCACCCTTGGAATGGCTG
 AAAACAGAGGTGAGCGAAGAGCAGCCGTCGAGAATAGATATGACTCTTGGGACCATGAG
 CAGGCCATGAAGGCTGCCGTGAGGAAGTTTATTTCTTACGATCAATTCTCAGCTCAGTT
 AAGAACTGGCGCGAAGCTAGGTTAAACATAATTGAACATGCCACTAGCGTGTGAGCC
 AGGTGTCTAATTTAGGTAGAACTCATTCTACAGTAGAACCGAACGCTTTGGTGGAAGT
 TCATTGTTGGTGATAAATTTGTACGTATGTCTGAATGAAACCAGAATGAAAACCGCGTT
 GAATAATATAATTTGTAGCGTTGCAGACAGTGAACGGCGAAGGGCGGGCAAGACGATTAG
 GTCCGAGAGAAGCTTCCGCGAACACCGGCGGGGAGGATAGCGCTCTGAATGTGGCACAT
 CAACTCGCAGAGGTGGACGATTTATTAAGTATGATGAAAGTTTTTTAAGAGAAGCTGTTTT
 TACTCAGGACAAATATGAGCTCGTGAACGGGTTA

1.7 PPV

GGGACAGATCAAATGAGCCAATCCATCGATTGGAGGCAATTTGTGCATCAATGGTGGAA
 GCGTGGGGTTATAAGGAGCTGCTGAGGGAGATCCGGAAATTTTACAGTTGGGTTCTTGA
 ACAAGCACCATACAATGCTCTTTCAAAGATGGAAAAGCCCCGTACATTGCGGAGACAG
 CACTGAAGAAGCTTTACTGACTGACTGAAGCATCTGAGACAGAAATTGAGCGATATCTT

GAAGCTTTTTACGACGACATTAACGATGATGGTGAGTCCAACGTTGTTGTGCACCAAGC
 TGACGAAAGAGAAGACGAGGAGGAAGTTGATGCAGGCAAGCCGATTGTAGTTACTGCAC
 CGGCAGCAACTAGCCCAATGCTTCAACCACCTCCAGTCATACAGCCTGCACCCCGACT
 ACGGCGCCAATGCTCAACCCCATTTTTACGCCAGCAACAACCTCAACCAGCAACAAAACC
 AGTTTCACAGGTGTCAGGACCTCAACTGCAAACTTTTGAACATATGGTAATGAGGATG
 CATCACCTAGCAACTCAAACGCGCTAGTCAACACAAAACAGAGACAGGGACGTGATGCA
 GGATCAATTGGAACTTTACAGTGCCACGTTTGAAGGCAATGACTTCGAAACTATCTCT
 GCCAAAGGTGAAGGAAAAGGCTATTATGAACTTGAACCATTTGGCACATTATAGTCCCTG
 CACAGGTTGACTTGTCAAACACGAGAGCTACGCAGTTTTGTTCCATACTTGGTATGAA
 GGAGTTAAGCGAGATTATGATGTCACGGACGATGAAATGATCATCATATTAATGGTCT
 TATGGTTTGGTGCATAGAGAATGGAACATCCCCGAATCTCAATGGAATGTGGGTGATGA
 TGGATGGGAAACACAAGTGGAGTATCCAATAAATCCATTGTTGGATCATGCGAAACCC
 ACTTTTAGACAAATTATGGCACATTTAGTAACGTGGCTGAAGCGTATATTGAAAACG
 AAATTATGAAAAAGCATAACATGCCAAGGTATGGAATTCAGCGCAACCTGACAGAATACA
 GCCTCGCCAGATATGCCTTTGATTTTTACGAAATGACTTCAACGACACCCGTACGGGCA
 CGTGAAGCTCATATCCAGATGAAGGCAGCAGCATTGAGA

1.8 PVT

CGTCAGTTAGGTCGGCGAGTTTGCCTCGATTTTTCATGTTCTGAGAGGTTAGAAAGGGGC
 TTTGAATCAGAGAGTCTGGCTGGATTAGTGCTAGATCAGAAATATGGACCCAACAACCTT
 TTGTGCAGATAAGAGACGAAGTCCTGAATCTGACAGTGGCAGCTTACAGCAGTCAATGG
 GACGGTCAAGCCACTCAGGCTCTGAAGGATGGGGCAAAGGAACAGATGTTGCGATTCCT
 CTTCCGGAAGAATCGCAATATCTTCAGCGAGTAGAAAACACCATCTGGCCTGACACGGAGA
 TCGCGTCCGAGGATCTCCAGATAGGTATGTCAGCGGCTTCAGCGGGTCCACCTCCAGTG
 GCTGCTGCTCCGATAAGCCTTACATTTAGGGTAAATTTTAATTCTTATGTCAAAATGCT
 AATAGCTTTGTCCAACACTTCAACAAATTCCTTTGTAAAGAATAAAAACACTCAGACAAA
 TGTGTATGCCTTTTGCAAAATATGCTTATGGATACTTATCTGAAATGGGCTATGCAACT
 TGGGCATATGAGAAAATGCCAAACTTTGTCGAAAGGCTAAATGGGTTGCTTTTCGATTT
 TGCATCTGGGTTGTTGATGATACAACAATGCAGTTGAATGATGATGAAAAGACCGTCA
 TTCAAGGTCTGGGAGCTAGGTTATTCAAAACCTCAACAGTCCATTCAAATTGCTGATTCC
 ACAATGGACGGTGAAGCTATCAATCGTGAAATTTGACTGAGAAAAGAGGAGAAGAGTTGG
 TCGTTTGTAAATCCGGCATAATTGGTCGCGGTCTTGAGGGTTGACTGGCCCTCATTTG
 AATAAATTTAAATCTGCATAATTGATCGCAGTCTAGGGAGTTGATATGCTCCCCCGA
 TGTTCTTAATCTAGGGTTTGCATGGTTTTTCAAGTTTTTAAAGC

1.9 PYV

AAGTATTATTCAAAGTGCCTTTTGGACCTAATTGTCCTGACTTAATTCTGAGTAGTA
 ATAGATCATCAGCTGAAGAGTTGAGGGAGAAAATTCAGGTTTCGAAATTGTTAAGTCG

AGATATGTTAGGACTTGGCGATTCGTTCCCTGATGAGCAACACTCCTCCTACTGCAAAGAA
ACTCTTCTTTGATGAGTGTTCATGCAACATGCTGGTTGCATTTATGCTGCCGCCACTT
TGGCGAAGTGTTCGGAGGTTTTTGC

1.10 TBSV

GGGATGAGCAACTGGCTCTGGAGGATCGTCTGGATAGATGGGAGATGGATTTATTTGGA
ATTGAAGGTGTTGACGCTCACGAGCCCAGCATCCTTGATTCCGCCGTAGCTTGACCAAG
TATACTAACACAAGAGATGGCGATGACAACGAGAAATAACAACAATGTGCTCGCTGT
GAGCAAGAAACAGTTGGGGTCTTAGCAGCATCTGCTGCTGCAGGGGCTCTGCGTAATT
ATATTAGTGAGAGTGGCCAGCACTGCTACAATCAGCAGTGGGTTTTGGGAAAGAAGGCC
TTAAATAAGGTGAGGAATCGAAGGAAACAGGGAAATCAGCAGATCATTACTCATGTTGG
TGGCGTTGGGGCTCAATCATGGCTCCTGTGGCGGTGTCCAGGCAACTAGTAGGTAGTA
AGCCGAAATTTACCGGAAGGACATCTGGATCTGTCACAGTTACGCACCGTGAGTACCTT
ACTCAAGTAAACAATTCCTCAGGATTCGTGGTAAATGGGGTATTGTGCGCAATTTGTT
ACAACCTCAATCCGTTGAATGGAACACTGTTCTCGTGGCTGCCTGCCATAGCATCCAATT
TTGATCAGTACTCATTAAACAACGTTGTGTTACATTACGTCCCCCTGTGCGGCACCACT
GAAGTAGGGCGTGTAGCGCTATACTTTGATAAGGACTCACAAGATCTTGAGCCTGCTGA
TAGAGTGGAGTTGGCGAACTTTGGTGTCTAAAAGAGACAGCCCCATGGGCTGAGGCGA
TGCTGCGCATACCCACTGACAAAGTTAAGAGATACTGTAATGACAGTTCCACAGTTGAT
CAGAAACTTATAGATTTGGGACAGCTTGGTATCGCTACTTATGGAGGAGCAGGTACAAA
TGCTGTAGGGGATGTGTTTCATCTCCTACAGTGTACACTGTACTTTCTCAACCCACCA
ACAC