

**TRANSMISSIBILIDADE E ANÁLISE DO GENOMA DA
ESTIRPE ANDINA DO *Potato virus S* (PVS) DETECTADA NO
BRASIL**

PRISCILLA DE SOUSA GERALDINO

2009

PRISCILLA DE SOUSA GERALDINO

Transmissibilidade e análise do genoma da estirpe andina do *Potato virus S* (PVS) detectada no Brasil

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

Orientadora

Profa. Dra. Antonia dos Reis Figueira

**LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL
2009**

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

Geraldino, Priscilla de Sousa.

Transmissibilidade e análise do genoma da estirpe andina do
Potato virus S (PVS) detectada no Brasil / Priscilla de Sousa
Geraldino. – Lavras : UFLA, 2009.
45 p. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2009.
Orientador: Antonia dos Reis Figueira.
Bibliografia.

1. *Myzus persicae*. 2. *Aphis gossypii*. 3. Viroses. 4. Batata. I.
Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 635.2198

PRISCILLA DE SOUSA GERALDINO

Transmissibilidade e análise do genoma da estirpe andina do *Potato virus S* (PVS) detectada no Brasil

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

APROVADA em 28 de janeiro de 2009.

Prof. Dr. Ricardo Magela de Souza

UFLA

Dra. Sara Maria Chalfoun

EPAMIG

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

LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL

AGRADECIMENTOS

A Deus pela providência em minha vida.

À professora Dra. Antonia, pelos ensinamentos, orientação, paciência, amizade.

Aos meus pais, Alvaci e Eli, pelo apoio constante, pelo amor, confiança e incentivo em todos os momentos da minha vida.

Aos meus irmãos Thiago e Matheus e às minhas cunhadas Lisandra e Narjara pelo apoio, pela presença e pelas alegrias.

Ao Whasley, pelo amor, companheirismo, paciência, pela força nos momentos que achei que não fosse conseguir.

Às amigas Suellen e Flávia, pela ajuda, pelas palavras de incentivo e pelos bons momentos.

Aos amigos João, Silvia e Valquíria pela amizade e ajuda constante.

Aos amigos do Centro de Indexação de Vírus, em especial à Jaciara, ao Carzinho e Luciene pelo apoio e amizade.

A todos os amigos do Departamento de Fitopatologia, pela convivência diária.

Ao professor Dr. Ricardo e Dra. Sara, pela participação na banca avaliadora.

A todos que contribuíram para a realização deste trabalho, mesmo que indiretamente,

MUITO OBRIGADA!

SUMÁRIO

RESUMO	1
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	4
2.1 Obtenção das plantas hospedeiras, origem e manutenção do isolado de PVS ^A	4
2.2 Transmissão por afídeos.....	5
2.3 DAS-ELISA	5
2.4 Análise do genoma da estirpe andina do PVS detectada no Brasil	6
2.4.1 Desenho de <i>primers</i>	6
2.4.2 Extração do RNA total.....	6
2.4.3 RT-PCR.....	9
2.4.4 Clonagem dos fragmentos e seqüenciamento	10
2.4.5 Análise das Sequências	11
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	13
3.1 Transmissão por afídeos.....	13
3.2 Análise do Genoma	16
4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	41

RESUMO

GERALDINO, Priscilla de Sousa. **Transmissibilidade e análise do genoma da estirpe andina do *Potato virus S* (PVS) detectada no Brasil**. 2009. 45 p.
Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Lavras,
Lavras.¹

Estudos moleculares preliminares realizados com a região da capa protéica do isolado da estirpe Andina do PVS (PVS^A), denominado de BB-AND, detectado pela primeira vez no Brasil em 2007, mostraram que este possui características diferentes dos outros já descritos em diferentes regiões do mundo. Nesse trabalho deu-se continuidade a esses estudos, avaliando-se a eficiência de transmissão desse isolado pelos afídeos *Myzus persicae* e *Aphis gossypii* e realizando-se o sequenciamento completo do seu genoma. Quando plantas de *Chenopodium quinoa* foram doadoras do inóculo, o BB-AND foi transmitido pelo *M. persicae* para 46,6% das plantas da mesma espécie e para 20% das plantas de batata. Por outro lado, esse vetor transmitiu o vírus para 10% das plantas de batata e 11% das plantas de *C. quinoa*, nos testes em que as plantas de batata foram empregadas como doadoras. O afídeo *Aphis gossypii* não transmitiu o BB-AND de plantas de batata para batata, apenas de batata para 3% das plantas de *C. quinoa* inoculadas. A transmissão foi maior quando a planta doadora foi *C. quinoa*, 3% das plantas de batata e 13,3% das plantas de *C. quinoa* inoculadas. Foram sequenciados 2810 nucleotídeos no terminal 5' do genoma viral, e 4712 no terminal 3', faltando o fragmento intermediário com 970pb. Considerando-se o fragmento da região 5' com 2810 nt, a identidade com os demais isolados do banco de dados variou de 75 e 76% enquanto que a identidade dos nucleotídeos do fragmento com 4712pb, variou de 81 a 85%. Analisando-se a região codificadora, identidade da sequência da região 5' ORF1 (RdRp) com os isolados de PVS^A foi de 75 a 80%. Na outra extremidade a identidade variou de 81 a 89%. As três ORFs seguintes, componentes do bloco triplo, apresentaram identidades semelhantes, de 82 a 90% quando comparadas com os outros isolados de PVS^A, e de 81 a 86% com os isolados comuns. A região da capa protéica mostrou identidades de 79 a 100% com os isolados andinos e 80 a 98% com os isolados comuns. A ORF 6 mostrou identidade de 81 a 89% com outros PVS^A e de 80 a 82% com PVS^O. Considerando-se as árvores baseadas nas sequências de aminoácidos e nucleotídeos, os isolados Andinos tenderam a se agrupar separadamente dos isolados comuns, entretanto o BB-AND sempre mostrou certa distância dos demais, mostrando uma clara distinção dos isolados Andinos disponíveis no GenBank.

¹ Comitê Orientador: Antonia dos Reis Figueira – DFPI/UFLA (Orientadora).

ABSTRACT

GERALDINO, Priscilla de Sousa. **Transmissibility and genome analysis of the Andean strain of Potato virus S (PVS) found in Brazil.** 2009. 45 p.
Dissertation (Master in Phytopatology) – Federal University of Lavras, Lavras.²

Preliminary studies with the coat protein region of the PVS Andean strain (PVS^A), detected for the first time in Brazil in 2007, showed that the isolate is different from other strains already described in other regions of the world. The objective of this study was to characterize the PVS^A, found in Brazil (BB-AND), assessing the isolate's transmission efficiency by the aphids *Myzus persicae* and *Aphis gossypii* and making the complete sequencing of its genome. When the inoculum donors were *Chenopodium quinoa* plants the isolate BB-AND was transmitted by the aphid *Myzus persicae* to 46.6% of plants from that same specimen. When potato plants were recipients and *C. quinoa* donors, the transmission rate was of 20%. On the other hand, when potato plants were inoculum donors, BB-AND was transmitted to 10% of potato plants and 11% of *C. quinoa* plants. The *Aphis gossypii* did not transmit the BB-AND from potato plants to potato plants, and the transmission was of only 3% of the *C. Quinoa* plants. The transmission rate was greater when the donor plant was *C. quinoa*, 3% of the potato plants and 13.3% of the *C. quinoa* inoculated plants. Almost the entire BB-AND genome was analyzed, with the exception of the fragment between nucleotides 2811 and 3780 which was not amplified. We sequenced 2810 nucleotides at the terminal 5' viral genome and 4712 in the terminal 3', missing the intermediate fragment with 970pb. Considering the fragment of the region 5' with 2810 nt, the identity with other isolates in the database ranged from 75 to 76% while the identity of the nucleotide fragment with 4712pb, ranged from 81 to 85%. Analyzing the coding region, sequence identity of region 5' ORF1 (RdRp) with PVS^A isolates was of 75 to 80%. At the other end the identity ranged from 81 to 89%. The three following ORFs, components of the block showed similar identities, 82 to 90% when compared with other isolates of PVS^A and 81 to 86% when compared with common isolates. The coat protein region showed identities of 79 to 100 % with Andean isolates and 80 to 98% with common isolates. The ORF 6 showed identity of 81 to 89% with other PVS^A and 80 to 82% with PVS^O. Considering the trees based on the nucleotide and amino acids sequences, the Andean isolates tend to form groups separated from common isolates. However, BB-AND remained separate from the others, presenting a clear distinction amongst the Andean isolates available at the GenBank.

² Guidance Committee: Antonia dos Reis Figueira – DFPI/UFLA (Major Professor).

1 INTRODUÇÃO

A batata (*Solanum tuberosum* L.) é uma das culturas mais importantes do Brasil. Em 2007, a área total cultivada foi de aproximadamente 143140 ha e a produção de 3393957 toneladas (Food and Agriculture Organization of the United Nations - FAO, 2008). O estado de Minas Gerais é o maior produtor de batata do país, com 70% de sua produção concentrada na região sul. Os principais centros consumidores da batata colhida em Minas Gerais são o Rio de Janeiro, São Paulo e Belo Horizonte. Dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE (2008) mostram uma produção estimada para Minas Gerais, em 2008, de 1,2 milhões de toneladas, o que significa mais de 30% do total produzido no Brasil. Apesar dessa alta produção, a sua produtividade é de 29,8 toneladas por hectare, o que fica bem abaixo da produtividade desejada, já observada em países tradicionais na produção e exportação de batata (IBGE, 2008).

A alta produtividade da cultura está diretamente ligada à sanidade das lavouras de batata, que por sua vez é determinada principalmente pela qualidade dos tubérculos empregados como sementes e do potencial de inóculo, dos diferentes patógenos, presente nas áreas empregadas para o plantio. Dentre os patógenos importantes para a cultura da batata, destacam-se os de etiologia viral, que podem causar a degenerescência dos tubérculos após poucas remultiplicações no campo. Os principais vírus para a cultura da batata no Brasil e no mundo são *Potato leafroll virus* (PLRV), *Potato virus Y* (PVY), *Potato virus S* (PVS) e *Potato virus X* (PVX), sendo que o PVY e o PLRV são os de maior ocorrência no campo (Silberschmidt, 1937; Silberschmidt & Kramer 1942; Silberschmidt, 1954; Costa, 1965; Cupertino et al., 1970; Figueira, 1995; Souza Dias, 1995; Daniels et al, 2002; Geraldino et al, 2006).

Apesar de sua baixa ocorrência nos campos brasileiros, o PVS é considerado o vírus mais comum nos campos de cultivo de batata em outras

partes do mundo, tendo sido relatado pela primeira vez em 1951, na Holanda (Hinoestroza-Orihuela, 1973; Bagnall, 1981; Dolby & Jones, 1987; Heldak, 2001). Ele pode induzir sintomas que variam desde latentes à forte rugosidade, mosaico, bronzeamento e, em alguns casos, manchas na superfície foliar, dependendo da cultivar e da estirpe do vírus. A maioria das cultivares comerciais de batata são tolerantes ao PVS, de modo que os sintomas são geralmente latentes, dificultando a sua detecção no campo. Mesmo assim, podem induzir perdas que variam de 10 a 20% quando presente sozinho na planta (Bagnal, 1981). Entretanto, se associado a outros vírus, pode ocorrer um efeito sinérgico, levando à perdas mais expressivas (Wright et al 1970; Wright, 1977; Manzer et al., 1978 ; Ribeiro et al., 2008).

Atualmente duas estirpes de PVS são conhecidas: a estirpe comum (PVS^O) e a estirpe Andina (PVS^A). A PVS^A difere da PVS^O principalmente por ser transmitida por afídeos de maneira não persistente ou estiletar, ou seja, tanto a aquisição quanto a inoculação do vírus é feita em poucos segundos (James & Perry, 2004), e por induzir sintomas sistêmicos em *Chenopodium spp.* (Hinoestroza–Orihuela,1973; Dolby & Jones, 1987; De Bokx, 1970; Rose,1983; Slack 1983; Foster & Mills 1992; Fletcher, 1996; Chikh et al., 2008), o que não ocorre com a estirpe comum. Além disso, a estirpe Andina pode provocar sintomas secundários mais fortes em plantas de batata e atingir altas concentrações virais nas folhas (Rose, 1983; Dolby & Jones, 1987). A alta transmissibilidade mecânica, aliada à transmissão pelo vetor, faz com que a estirpe Andina tenha uma grande importância, principalmente em países como o Brasil onde há uma alta densidade populacional de vetores durante todo o ano.

O PVS é membro do gênero *Carlavirus*, família *Flexiviridae* (Adams et al., 2004) e possui partícula flexuosa com aproximadamente 650 nm de comprimento por 12 nm de diâmetro, composta de uma fita simples de RNA positivo (ssRNA) com cerca de 8,5 Kb (Wetter, 1971; Monis & Zoeten, 1990;

Matousek et al., 2005). Possui uma região não codificadora nos primeiros 62 nt, seguida por 6 ORFs (Open Reading Frames), sendo a primeira do nucleotídeo 63 ao 5983, codificando a proteína de replicação característica para os *Carlavirus*, com domínios para metiltransferase, helicase e RNA polimerase dependente de RNA (RdRp) (Matousek et al., 2005). Em seguida localiza-se um bloco com 3 ORFs, denominado de bloco triplo, na região do nucleotídeo 5970 ao 7169, que codifica as proteínas 25K, 12K e 7K, envolvidas no movimento do vírus célula à célula (Foster, 1992). A quinta ORF está localizada entre os nucleotídeos 7211 a 8095, com aproximadamente 34K, e codifica a capa protéica. Finalmente, na região 3' se encontra a última ORF, que codifica uma proteína com aproximadamente 11K, seguida por uma cauda poliA (Mackenzie et al., 1989). Acredita-se que a proteína 11K dos carlavirus poderia atuar de maneira similar à Hc-Pro dos *Potyvirus*, que atua na transmissão por afídeos (Foster & Mills, 1990). Entretanto, as estirpes comuns não são transmissíveis pelos insetos e também possuem a proteína 11K.

A estirpe Andina do PVS foi primeiramente detectada no Brasil por (Ribeiro & Figueira, 2008), quando fizeram a caracterização de diversos isolados de PVS provenientes de diferentes regiões produtoras. Estudos preliminares revelaram que esse isolado, denominado de BB-AND, tinha características moleculares diferentes das demais já descritas em outras partes do mundo e se assemelhava a um outro isolado detectado em material proveniente da região Andina (Figueira et al., 2008).

O objetivo desse trabalho foi dar continuidade a esses estudos, avaliando-se a eficiência da transmissão do PVS^A por afídeos e sequenciar completo do isolado Andino encontrado no Brasil, para compará-lo com os demais disponíveis no banco internacional de dados.

2 MATERIAL E MÉTODOS

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

2.1 Obtenção das plantas hospedeiras, origem e manutenção do isolado de PVS^A

As plantas foram obtidas por sementeira inicial em bandejas e posterior transplante para vasos com capacidade de 2 kg contendo como substrato terra esterilizada, areia e esterco, na proporção 3:1:1. A inoculação foi feita quando as plantas apresentavam 3 a 4 folhas definitivas, com o extrato obtido a partir da maceração de 1g de folhas infectadas em 10 mL de solução de fosfato potássio a 1%, pH 8 (Hiruki, 1974). Esse extrato foi friccionado nas folhas das plantas de *C. quinoa*, previamente polvilhadas com carborundum (400 mesh), e posteriormente essas foram lavadas com água corrente e as plantas mantidas em casa de vegetação até o aparecimento dos sintomas.

O isolado estudado proveniente da detecção realizada por Ribeiro & Figueira (2008), foi mantido no Departamento de Fitopatologia da UFLA de três diferentes maneiras: em tubérculos de batata provenientes de plantas infectadas, armazenados na câmara fria a 8 °C, em folhas de *Chenopodium quinoa*, com sintomas típicos, desidratadas e congeladas a -20°C e em folhas infectadas congeladas a -70°C. O vírus foi reinoculado periodicamente em plantas de *C. quinoa*, sempre que se pretendia fazer a multiplicação do inóculo. Esse isolado tem sido mantido também em tubérculos de batata cultivares Monalisa e Ágata. Para a obtenção de plantas de batata infectadas a partir de tubérculos, esses foram submetidos a forçamento de brotação com bissulfureto de carbono (25mL/m³) por 72h e, após a emergência dos brotos, os tubérculos foram

plantados em vasos com capacidade de 5 kg, mantidos em casa de vegetação até o final do ciclo, para produção de novos tubérculos para armazenamento.

2.2 Transmissão por afídeos

A transmissão por afídeos foi realizada utilizando-se duas espécies de afídeos comumente encontradas no campo: *Myzus persicae* Sulz. e *Aphis gossypii* Glover. Foram inoculadas 10 plantas, com 3 repetições.

Os afídeos foram devidamente identificados por profissionais da área. A população de *Myzus persicae* foi mantida em plantas sadias de *Datura stramonium* e a de *Aphis gossypii* em plantas de *C. quinoa*, em gaiolas separadas. Ápteros adultos foram retirados das folhas com um pincel e colocados em placas de Petri, onde permaneceram em jejum por 3h em temperatura ambiente. Após esse período os afídeos foram colocados nas folhas infectadas de batata, cv. Monalisa, ou nas folhas infectadas de *C. quinoa*, apresentando sintomas sistêmicos, por um período de 30 minutos. Em seguida foram transferidos 10 pulgões para cada planta sadia de *C. quinoa* e/ou de batata, cv. Ágata, onde permaneceram por 10 a 12 horas antes da aplicação de inseticida sistêmico para a sua eliminação. As plantas inoculadas foram mantidas em casa de vegetação até o aparecimento e avaliação visual dos sintomas, aproximadamente 30 dias após a inoculação. Tanto as plantas com sintomas como as que não apresentaram sintomas visíveis foram submetidas ao teste DAS-ELISA para confirmação da infecção.

2.3 DAS-ELISA

O teste DAS-ELISA foi feito utilizando-se o anti-soro policlonal da Bioreba para detecção do PVS, seguindo o protocolo recomendado pelo fabricante. As soluções tampões foram preparadas no laboratório. Os tampões

utilizados foram: tampão de cobertura (carbonato bicarbonato 0,025M, pH 9,6, contendo 0,02 g/L de azida sódica); tampão de extração do vírus (Tris-HCl pH 7,4, contendo 0,8% de NaCl, 2% de PVP, 0,02% de KCl e 0,02% de azida sódica); tampão do conjugado (Tris-HCl, pH 7,4, contendo 0,8% de NaCl, 2% de PVP, 0,2% de BSA, 0,02% de MgCl₂, 0,02% de KCl, 0,02% de azida sódica, 0,05% de Tween 20); tampão do substrato (dietanolamina pH 9,8) e tampão de lavagem (solução salina tamponada, PBS, contendo 0,05% de Tween 20).

Foram utilizadas as microplacas padrão de poliestireno, marca Costar, com 96 orifícios, sendo que as leituras foram realizadas entre 30 e 60 minutos após a adição final do substrato, a 405 nm no espectrofotômetro MRX (Dynatech). As amostras, cujas absorbâncias foram iguais ou superiores a duas vezes a média da absorbância do controle sadio, foram consideradas positivas. No caso dos testes em que as concentrações virais das plantas foram comparadas, tomou-se o cuidado de pesar as folhas para garantir a mesma proporção peso de folha/volume de solução extratora.

2.4 Análise do genoma da estirpe andina do PVS detectada no Brasil

2.4.1 Desenho de *primers*

Os *primers* foram desenhados com base no alinhamento das duas únicas sequências de nucleotídeos de PVS^A disponíveis no GenBank, sob nº D00461 e AJ863510 (Tabela 1). A estratégia para realizar o sequenciamento do genoma do vírus foi a de sobreposição de fragmentos (Figura 1).

2.4.2 Extração do RNA total

O RNA foi extraído de folhas jovens de *Chenopodium quinoa* apresentando sintomas sistêmicos característicos do PVS^A, utilizando os

métodos de extração de Chang et al. (1993) e Trizol (Australian Food and Grocery Concil – AFGC, 2002).

Tabela 1 Sequência dos primers desenhados para a amplificação do genoma do isolado brasileiro de PVS^A (BB-AND).

Nome do Primer	Sequencia	Posição (nt)	Região Gene
PVSF1	GATAAACACTCCCGAAAATAA	1-21	Não codificável
PVSR493	CCATGGTGCCGCTTGAGTTCG	472-493	RdRp
PVSF430	GGTATGTGAGCAGTGCCG	430-448	RdRp
PVSR1949	CGACCATCGTGCCCCC	1933-1949	RdRp
PVSR2910	CGATGATGGCCTCCT	2896-2910	RdRp
PVSF2811	CGAGGATTGCAACAG	2811-2825	RdRp
PVSR3780	TTTCTTCAGTAGCGCTCT	3766-3780	RdRp
PVSF3664	CCCCAAGGAAGCATT	3664-3678	RdRp
PVSF4532	GGGTGATCCGTGGTT	4532-4546	RdRp
PVSR5512	GCCTCACCRGAGAAG	5498-5512	RdRp
PVSF5413	GGGCTGCCCCAATGA	5413-5427	RdRp
PVSR6373	TGCCAAAGCGATGGC	6359-6373	25K
PVSF7955	CGCTCACAAGAGCATGGC	7955-7972	CP
PVSR8094	CGTTCCGCTTTCATTGG	8078-8094	CP
PVSR8464	ATGCTAAAATATTTTAAAAAC	8444-8464	Não codificável

Sendo: Y= T ou C; R = G ou A

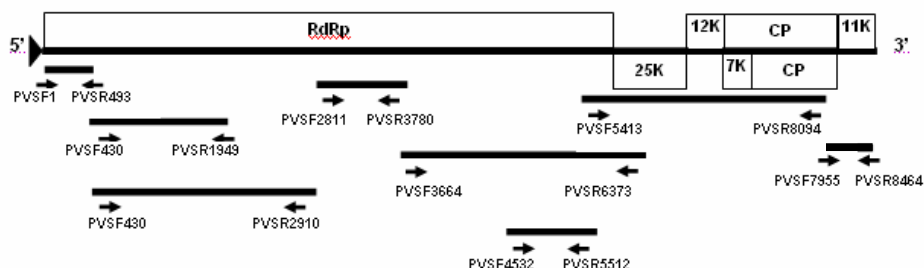


Figura 1 Posição relativa dos *primers* empregados para amplificar o genoma do isolado brasileiro de PVS^A (BB-AND).

No primeiro método, 0,4g de tecido infectado foram macerados em almofariz na presença de nitrogênio líquido e, ao pó obtido, acrescentou-se 2 mL do tampão de extração (2% CTAB - Hexadecyltrimethylammonium bromide, 2% PVP - Polyvinylpyrrolidone K 30, 100mM Tris-HCl, 25mM EDTA, 2.0M NaCl, 0,5 g/L espermidina) contendo 2% de β -mercaptoetanol, pré-aquecido a 65°C. Após a homogeneização, o macerado foi distribuído em microtubos de 1,5 mL, adicionando-se igual volume de solução de clorofórmio (CL) e álcool isoamílico (AI) na proporção de 24:1. Os microtubos foram agitados em vortex e centrifugados durante 10 minutos, sendo o sobrenadante transferido para novos tubos, repetindo-se o passo anterior. Após a centrifugação, o sobrenadante foi cuidadosamente coletado e transferido para novos tubos, fazendo-se então a adição de $\frac{1}{4}$ do volume de solução LiCl 10M. Os tubos foram agitados e incubados por 2h a -20°C ou overnight a 4°C. Para lavagem do RNA os microtubos foram centrifugados a 12000 rpm por 20 minutos e o sobrenadante descartado. O pellet obtido foi dissolvido em 500 μ L de SSTE (1.0 M NaCl, 0,5% SDS, 10mM Tris-HCl-pH8, 1mM EDTA-pH 8). Foram então novamente

adicionados 500µL da solução de CL:AI (24:1). Os microtubos foram agitados em vortex e centrifugados a 12000 rpm por 10 minutos. O RNA foi precipitado pela adição do dobro de etanol absoluto gelado, incubação a -80°C por 30 min e centrifugação a 12000 rpm por 20 minutos. O precipitado foi lavado com etanol a 70%, secado a vácuo e ressuspendido em 25µL de água ultrapura tratada com DEPC (Dimetil pirocarbonato).

Na extração do RNA total pelo método de Trizol utilizaram-se folhas de *C. quinoa* infectadas com o PVS^A, 0,4g de tecido foram maceradas na presença de nitrogênio líquido e homogeneizadas em 6 mL da solução tampão Trizol (38% de fenol saturado em solução de Tris-HCl 0,5M pH 8, 0,8M de guanidina tiocianato, 0,4M de amônio tiocianato e 0,1M de acetato de sódio, pH5, 5% de glicerol e água suficiente para completar o volume final da solução). O extrato foi distribuído em microtubos e incubado em banho-maria a 60°C por 5 minutos. Em seguida os tubos foram agitados e centrifugados por 10 minutos a 12000 rpm e 4°C. O sobrenadante foi transferido para novos tubos e adicionados 240 µL de clorofórmio. Em seguida os tubos foram agitados, deixados em temperatura ambiente por 3 minutos, centrifugados a 12000 rpm por 10 minutos e o sobrenadante transferido para novos microtubos. Logo após foi adicionado ½ do volume da solução contendo 0,8M de Citrato de Sódio e 1,2M de Cloreto de Sódio e ½ volume de isopropanol. Os tubos foram agitados gentilmente por inversão, deixados em temperatura ambiente por 10 minutos, centrifugados a 12000 rpm por 10 minutos e o sobrenadante descartado. O precipitado foi lavado com etanol a 70%, secado a vácuo e ressuspendido em 25 µL de água ultrapura tratada com DEPC.

2.4.3 RT-PCR

O cDNA foi sintetizado utilizando-se os *primers* antisense, listados na Tabela 1, e a transcriptase reversa M-MLV da Promega, por meio da seguinte

reação: a mistura contendo 5µL de tampão da enzima (5X), 2µL de dNTP, 10mM, 1µL de DTT, 1µL do primer antisense 10pM, 0,8µL de M-MLV RT, 5µL do RNA total e água ultrapura com DEPC para completar o volume total de 20µL foi incubada em termociclador PTC-100 (MJ Research) por 60 minutos a 42°C e a 95°C, por 5 minutos e transferida para um recipiente com gelo.

A reação de PCR foi montada para um volume final de 50 µL, contendo: 2µL do cDNA, 10 µL do tampão da enzima (5X), 3 µL MgCl₂, 25mM, 1 µL dNTP, 10mM, 25 pM de cada um dos *primers* senso e antisense, 0,25µL da enzima GoTaq® Flexi DNA Polymerase (Promega) e 28,75 µL de água ultrapura tratada com DEPC. O ciclo empregado foi: 95°C por 40 segundos, 42-54°C por 55 segundos a 1 minuto e 72°C por tempo variável com o tamanho do DNA a ser amplificado (1min/Kb) (30 vezes) e uma temperatura final de extensão de 72°C por 5 minutos. Os produtos foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 0,7%.

2.4.4 Clonagem dos fragmentos e seqüenciamento

Os produtos de PCR amplificados foram purificados a partir do gel de agarose com o Kit GFX™ PCR DNA da GE, seguindo-se o protocolo recomendado pelo fabricante. Após a purificação os fragmentos foram clonados no vetor pGEM-T Easy (Promega), seguindo-se também o protocolo específico. Os plasmídeos recombinantes foram usados para transformação de *E.coli* DH5α que foram plaqueadas em meio sólido e multiplicadas em meio líquido, com posterior purificação do DNA plasmidial, empregando-se o método da lise alcalina (Sambrook et al., 1989).

Os plasmídeos contendo os diversos fragmentos genômicos amplificados foram liofilizados e enviados para seqüenciamento na MacroGen – Coreia.

2.4.5 Análise das Sequências

As sequências foram inicialmente analisadas por meio do programa BLAST, disponível no National Centre for Biotechnology Information - NCBI (2008). O alinhamento das seqüências de nucleotídeos e de aminoácidos foi feito utilizando-se o programa CLUSTALW (European Bioinformatics Institute, 2008). A comparação com outros isolados de PVS^A e PVS^O foi feita utilizando-se as seqüências disponíveis no “GenBank” (Tabela 2) e as árvores filogenéticas foram obtidas por meio do programa MEGA 4.0 (Center for Evolutionary Functional Genomics, 2008), com bootstrap, considerando valores superiores a 2.000 repetições.

Tabela 2 Relação dos isolados virais disponíveis no GenBank empregados para comparação das sequências de nucleotídeos e aminoácidos do isolado de PVS^A brasileiro BB-AND.

Acesso	Origem	Vírus/Estirpe	Autores/publicação
AB364945	Síria	PVS ^O	Chikh Ali et al. (2008) (Não publicado)
AF493950	Inglaterra	PVS ^O	Boonham et al. (2003)
AF493951	Inglaterra	PVS ^A	Boonham et al. (2003)
AJ863509	Alemanha	PVS ^A	Matousek et al. (2005)
AJ863510	Rep. Tcheca	PVS ^A	Matousek et al. (Não publicado)
AJ889246	China	PVS ^O	Shi et al. (Não publicado)
AY512653	China	PVS ^O	Chen & Du (Não publicado)
D00461	Canadá	PVS ^A	Mackenzie et al. (1989)
DQ000231	Rep. Tcheca	PVS ^A	Bystricka,D.et al. (2005) (Não publicado)
DQ000232	Rep. Tcheca	PVS ^O	Bystricka,D.et al. (2005) (Não publicado)
DQ000233	Rep. Tcheca	PVS ^A	Bystricka,D.et al. (2005) (Não publicado)
DQ000234	Rep. Tcheca	PVS ^O	Bystricka,D.et al. (2005) (Não publicado)
DQ315387	China	PVS ^O	Wu et al. (Não publicado)
DQ786653	India	PVS ^O	Gawande et al. (Não publicado)
EF397749	Iran	PVS ^O	Pourrahim,R et al. (2007) (Não publicado)
EU433399	Canadá	PVS ^O	Nie,X et al. (2008) (Não publicado)
L25658	Nova Jersey	BBScV	Lawrence et al. (1995)
NC007289	Rep. Tcheca	PVS ^A	Matousek et al. (2005)
S45593	Inglaterra	PVS ^O	Foster & Mills (1992)
U74375	Coréia do Sul	PVS ^O	Joung (Não publicado)
Y15618	Rep. Tcheca	PVS ^O	Matousek et al. (2000) (Não publicado)
Y15620	Rep. Tcheca	PVS ^O	Matousek et al. (2000) (Não publicado)
Y15622	Rep. Tcheca	PVS ^O	Matousek et al. (2000) (Não publicado)
Y15623	Rep. Tcheca	PVS ^O	Matousek et al. (2000) (Não publicado)
Y15625	Rep. Tcheca	PVS ^O	Matousek et al. (2005)

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Transmissão por afídeos

O isolado BB-AND, foi transmitido pelo afídeo *Myzus persicae* para 46,6% das plantas de *C. quinoa* inoculadas, quando a planta doadora do inóculo foi essa mesma espécie (Tabela 3). Ribeiro (2007) obteve uma taxa de 11,4% de transmissão desse vírus, quando utilizou plantas de *C. quinoa* como doadoras e receptoras do inóculo. A maior taxa de transmissão obtida nesse trabalho pode estar ligada às condições ambientais e mesmo às características do vetor, pois sabe-se que pode haver uma variabilidade na taxa de transmissão devido às diferenças entre biótipos de afídeos na sua habilidade de transmitir viroses (Wardrop et al., 1989). Quando foram empregadas plantas de batata como receptoras e de *C. quinoa* como doadoras, o índice de transmissão foi de 20%, ou seja, menos da metade do obtido quando a planta receptora foi *C. quinoa*. Quando a planta de batata foi usada como doadora do inóculo, as porcentagens de transmissão foram menores, de 10% e 11%, para as plantas de batata e *C. quinoa*, respectivamente. Essa menor taxa pode ter sido devido à concentração de vírus na planta de batata, pois quando se comparou o resultado do teste ELISA, realizado com o extrato foliar na mesma concentração (p/v), a absorvância foi, em média, de 0,863 em plantas de batata e de 1,143 em plantas de *C. quinoa*. De fato, as plantas de batata apresentam uma tolerância ao PVS.

O *Aphis gossypii* foi bem menos eficiente como vetor e não conseguiu transmitir o BB-AND de plantas de batata para batata, tendo conseguido transmitir dessa para apenas 3% das plantas de *C. quinoa*. A taxa de transmissão foi maior quando a planta doadora foi *C. quinoa*, tendo sido de 3,3% e de 13,3% para plantas de batata e de *C. quinoa*, respectivamente.

Slack (1983) observou uma taxa de transmissão semelhante, quando empregou o *Myzus persicae* e a planta de batata como doadora de inóculo, tendo

sido de 10% para batata, e de 13% para plantas de *C. quinoa*. Fletcher (1996), também descreveu taxa semelhante de transmissão para um isolado de PVS^A na Nova Zelândia, ou seja, 10% de transmissão de plantas de batata para batata. Relatos de menores taxas de transmissão do PVS^A por *Myzus persicae* também foram descritos por Wardrop et al. (1989), que conseguiram uma taxa de 5,9% de batata para batata. Kostiw (2004) estudou o efeito do tempo de alimentação de afídeos na transmissão de PVS e observou uma taxa de 2,9% quando o tempo de alimentação foi de 30 segundos a 2 minutos. Conforme já comentado anteriormente, essa variação das taxas é esperada pela possível diferença entre os biótipos de afídeos, principalmente aqueles que são mantidos em laboratório (Wardrop et al., 1989).

Tabela 3 Taxa de transmissão da estirpe andina do *Potato virus S*, isolado BB-AND, por duas espécies de afídeos: *Myzus persicae* e *Aphis gossypii*.

Planta Teste doadora de inóculo	Número de plantas inoculadas (INO)/Número de plantas infectadas (INF) e porcentagem de infecção (%) apresentada pelas plantas das duas espécies inoculadas com os afídeos							
	<i>Myzus persicae</i>				<i>Aphis gossypii</i>			
	Batata		<i>Chenopodium quinoa</i>		Batata		<i>Chenopodium quinoa</i>	
	INO/INF	%	INO/INF	%	INO/INF	%	INO/INF	%
Batata	30/03	10,0	30/07	11,6	30/0	0	30/01	3,3
<i>C. quinoa</i>	30/06	20,0	30/14	46,6	30/01	3,3	30/04	13,3

Temperatura máxima 28°C e mínima de 13°C

Existem muitos relatos da transmissão do PVS por afídeos, porém a maioria além do *Myzus persicae* estuda a transmissão da virose por *Aphis*

nasturtii (Kostiw, 1975). Wardrop et al. (1989) verificaram que, em condições de laboratório, *M. persicae* e *Aphis nasturtii* transmitiram o vírus S para plantas saudáveis com uma taxa de 5,9% e 14,3% respectivamente. Kostiw (2004) traçou um gráfico que mostra o efeito do tempo de alimentação do *A. nasturtii* na transmissão do PVS, porém relatos da transmissão da estirpe andina pelo *A. gossypii* ainda não foram registrados no Brasil.

Uma das causas do PVS não ser tão importante nos campos produtores de batata é o fato de a maioria dos isolados, que geralmente pertencem à estirpe comum, não serem transmitidos por vetores e apenas por sementes infectadas. Assim, se as sementes empregadas forem livres de vírus, o seu controle no campo se dá por exclusão, não havendo o risco desse ser transmitido de fora para dentro da cultura. Se for introduzido via sementes, adquire importância devido à sua fácil transmissão mecânica e efeito sinérgico com outros vírus, podendo levar a perdas significativas na produção (Bagnall, 1981; Wright et al., 1970; Ribeiro et al., 2008). Entretanto, os isolados da estirpe Andina, que além de serem transmitidos pelo tubérculo, podem ser transmitidos pelo vetor, significam um risco adicional, uma vez que ele pode ser levado para hospedeiras alternativas, entre uma cultura e outra, e ser introduzido de fora para dentro da cultura, mesmo que as sementes empregadas tenham sido isentas de vírus. Além disso, a sua dispersão dentro da cultura também será aumentada pelo vetor, fazendo com que a sua importância seja bem maior do que as estirpes comuns, pois terá um maior potencial para causar perdas de produção. Deve-se, portanto, tomar os cuidados necessários para que esse vírus não esteja presente nas sementes, para que o seu potencial de inóculo nas hospedeiras selvagens não seja mais um fator a comprometer a rentabilidade da cultura da batata no Brasil.

3.2 Análise do Genoma

Os *primers* desenhados com base no genoma dos isolados Andinos disponíveis no GenBank permitiram a amplificação de quase todo o genoma do BB-AND, com exceção do par de *primers* desenhado para o fragmento entre os nucleotídeos 2811 e 3780, ou seja, um total de 970pb que não foram analisados no presente trabalho. Portanto, foram obtidos os primeiros 2.810 nucleotídeos da região C-terminal da proteína RdRp e o primeiro fragmento de 62pb não codificante. A identidade deste terminal 5' do BB-AND variou de 75 a 76% quando comparado com outros isolados da estirpe Andina disponíveis no banco de dados. Entretanto, quando os isolados andinos do GenBank foram comparados entre si, a identidade foi bem maior, variando de 97 a 100%, mostrando que o BB-AND foi o único que apresentou uma baixa identidade nessa região. Observou-se ainda que o *Blueberry scorch virus* (BIScV) apresentou uma identidade com os isolados de PVS^A que variou de 66 a 67% (Tabela 4).

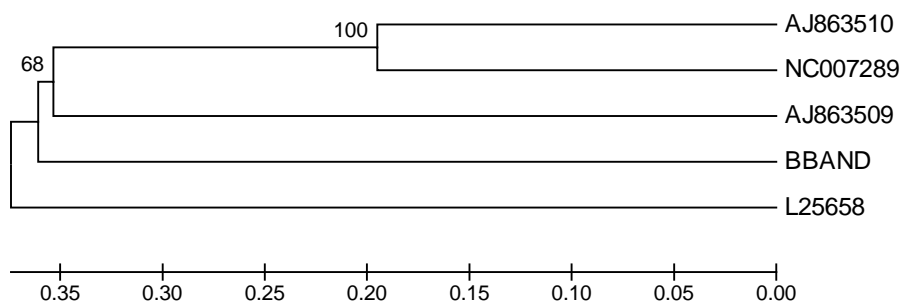
Tabela 4 Porcentagem de identidade entre as sequências de nucleotídeos da região não codificante e C-terminal da proteína RdRp do isolado BB-AND e da mesma região de outros isolados de *Potato virus S* (PVS) e um isolado de *Blueberry scorch virus* (BIScV).

	AJ863509 ¹	AJ863510 ¹	NC007289 ¹	L25658 ²
BB-AND ¹	75	76	75	66
AJ863509 ¹	-	97	100	66
AJ863510 ¹	-	-	97	67
NC_007289 ¹	-	-	-	66

¹Estirpe andina do *Potato virus S* e ²*Blueberry scorch virus*

A análise da árvore de nucleotídeos desta mesma região (Figura 2) mostrou que os isolados andinos ficaram agrupados sendo que, o BB-AND e o isolado AJ863509 ficaram separados em dois subgrupos diferentes e os outros dois isolados formaram um terceiro agrupamento.

Figura 2 Árvore filogenética construída com base na sequência de nucleotídeos da região não codificante e C-terminal da proteína RdRp do BB-AND. Os valores de bootstrap foram obtidos pelo programa MEGA e UPGMA, com 2.000 repetições.



A região N-terminal da proteína RdRp até a região não codificante da extremidade 3' apresentou um comprimento de 4712 nucleotídeos, representando 55,67% do genoma completo do vírus. Quando a sequência de nucleotídeos dessa região foi comparada à de outros isolados de PVS^A, observou-se uma identidade de 81 a 85%. Quando comparada ao isolado comum, essa identidade foi de 83% (Tabela 5). Os isolados Andinos do GenBank apresentaram uma identidade entre si de 91% a 100% e, quando comparados ao PVS^O, essa identidade foi 87 a 95%. Ainda assim foi maior que a identidade apresentada pelo isolado brasileiro, mostrando que este é bastante diferente.

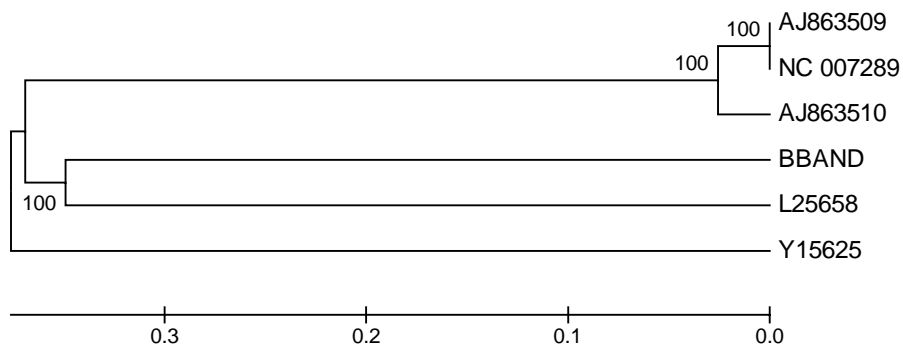
Tabela 5 Porcentagem de identidade na sequência de nucleotídeos da região N-terminal da proteína RdRp até a extremidade 3' do genoma viral entre o isolado BB-AND e a mesma região de outros isolados de *Potato virus S* (PVS) e um isolado de *Blueberry scorch virus* (BIScV).

	AJ863509 ¹	AJ863510 ¹	NC_007289 ¹	Y15625 ²	L25658 ³
BB-AND ¹	81	85	81	83	63
AJ863509 ¹	-	91	100	95	62
AJ863510 ¹	-	-	91	87	62
NC_007289 ¹	-	-	-	95	62
Y15625 ²	-	-	-	-	65

¹ Estirpe andina do *Potato virus S* ; ² Estirpe comum do *Potato virus S* e ³ *Blueberry scorch virus*

Apenas cinco isolados do GenBank foram utilizados na árvore filogenética, cuja construção baseou-se nas seqüências de nucleotídeos desta mesma região do genoma, pois não havia outros disponíveis com seqüenciamento completo do genoma (Figura 3). Nesta árvore os isolados Andinos do GenBank, provenientes de países europeus, se reuniram em um mesmo subgrupo, ficando o BB-AND separado em outro subgrupo, juntamente com o BIScV, enquanto que o PVS ficou separado em outro grupo.

Figura 3 Árvore filogenética construída com base na sequência de nucleotídeos da região N-terminal da proteína RdRp até a proteína 11K do BB-AND. Os valores de bootstrap foram obtidos pelo programa MEGA e UPGMA, com 2.000 repetições.



Considerando a sequência da região 5' da RdRp, com 2848 nucleotídeos, a identidade com os isolados de PVS^A foi de 75 a 80%. Observou-se também que a identidade entre essa região do BB-AND e a região similar do *Carlavirus* B1ScV foi de 66%, enquanto a identidade entre os outros isolados Andinos e o B1ScV foi de 65 e 66%(Tabela 6). Esta região do genoma não foi comparada com isolados de PVS^O, pois ainda não há sequenciamento disponível para esta região no banco de dados.

Tabela 6 Porcentagem de identidade na sequência de nucleotídeos (nt) e aminoácidos (aa) da região 5' da ORF1 entre o isolado BB-AND e outros isolados de *Potato virus S* (PVS) depositados no GenBank.

	nt	BB-AND ¹	AJ863509 ¹	AJ863510 ¹	NC 007289 ¹	L25658 ²
aa						
BB-AND ¹			75	75	80	66
AJ863509 ¹		75		97	100	65
AJ863510 ¹		73	92		98	66
NC 007289 ¹		88	100	94		65
L25658 ³		66	65	63	65	

¹ Estirpe andina do *Potato virus S* e ² *Blueberry scorch virus*.

A análise da árvore de nucleotídeos da região 5' da RdRp (Figura 4) mostrou que BB-AND se agrupou com os isolados da estirpe andina AJ863509 e NC 007289 e, o outro isolado, AJ863510, ficou em um subgrupo separado sendo que, na árvore gerada a partir da sequência de aminoácidos houve a formação dos mesmos grupos, mostrando que, com base nessa região, os isolados apresentam maior distanciamento filogenético (Figura 5).

Figura 4 Árvore filogenética construída com base na sequência de nucleotídeos da região 5' da ORF1 do BB-AND. Os valores de bootstrap foram obtidos pelo programa MEGA e UPGMA, com 2.000 repetições.

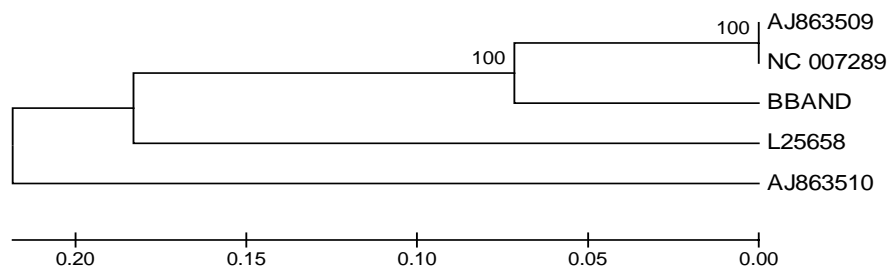
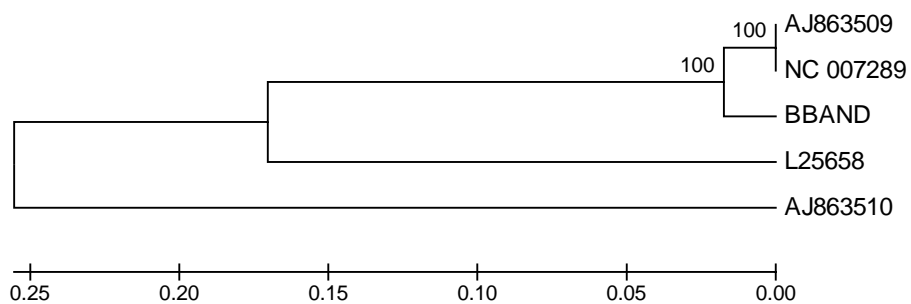


Figura 5 Árvore filogenética construída com base na sequência de aminoácidos da região 5' da ORF1 do BB-AND. Os valores de bootstrap foram obtidos pelo programa MEGA e UPGMA, com 2.000 repetições.



A identidade da região 3' da mesma ORF, contendo 2319 nt, com os outros isolados Andinos foi um pouco maior, de 81 a 89%. Por outro lado, as identidades dessa região de todos os isolados Andinos com o BLSv foram iguais a 70% (Tabela 7).

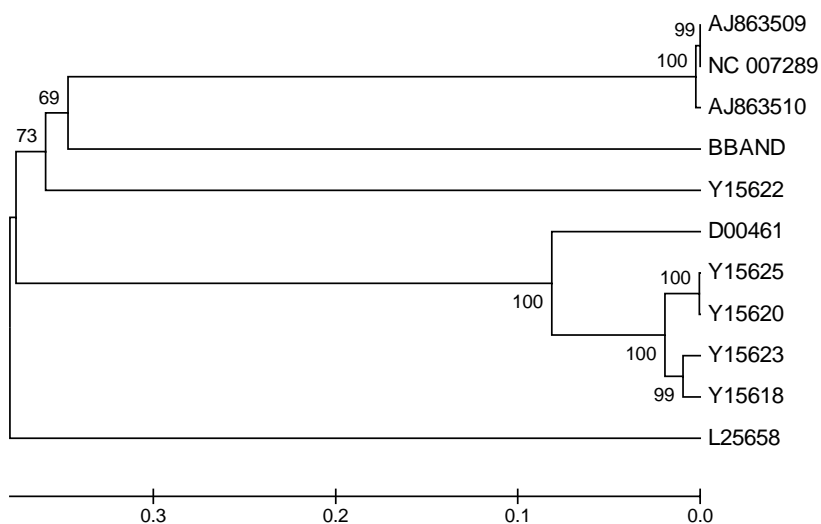
Tabela 7 Porcentagem de identidade na sequência de nucleotídeos (nt) e aminoácidos (aa) da região 3' da ORF1 entre o isolado BB-AND e outros isolados de *Potato virus S* (PVS) depositados no GenBank.

	nt	BB-AND ¹	AJ863509 ¹	AJ863510 ¹	D00461 ¹	NC 007289 ¹	Y15618 ²	Y15620 ²	Y15622 ²	Y15623 ²	Y15625 ²	L25658 ³
aa												
BB-AND ¹			81	81	89	81	83	84	84	84	84	70
AJ863509 ¹	91			99	83	100	97	95	95	99	95	70
AJ863510 ¹	91	98			83	99	97	94	95	98	94	70
D00461 ¹	96	96	96			83	84	83	83	84	83	70
NC 007289 ¹	91	100	98	96			97	95	95	99	95	70
Y15618 ²	96	98	97	96	98			96	96	98	96	70
Y15620 ²	97	98	98	97	98	98			99	95	99	70
Y15622 ²	97	99	98	97	99	98	99			95	99	70
Y15623 ²	96	98	98	96	98	98	98	99			95	69
Y15625 ²	96	98	98	96	98	98	99	99	98			70
L25658 ³	81	81	81	81	80	80	80	81	80	80		

¹ Estirpe andina do *Potato virus S*; ² Estirpe comum do *Potato virus S* e ³ *Blueberry scorch virus*.

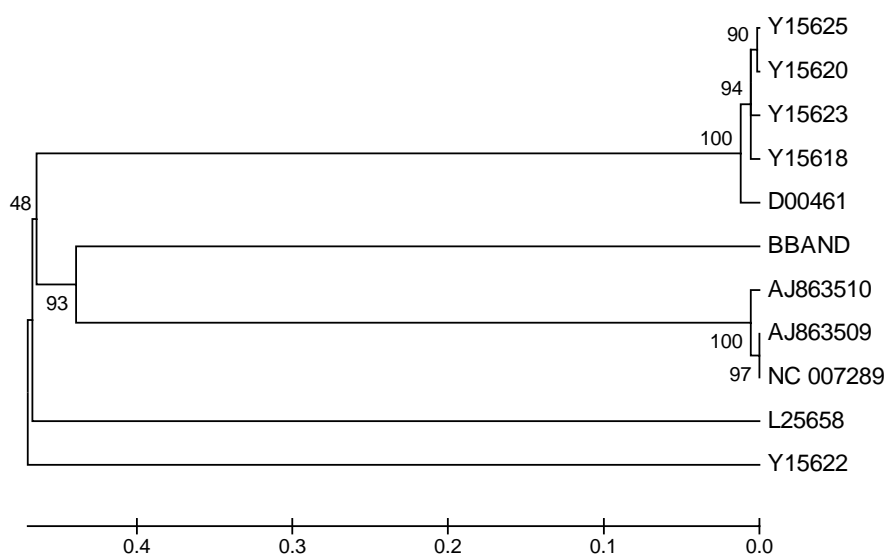
Na árvore filogenética baseada na sequência de nucleotídeos desta única região da ORF1, não houve um agrupamento definido de isolados andinos separados dos comuns. Provavelmente quando a ORF for completamente sequenciada, essa definição de estirpes volte a ser mais evidente (Figura 6).

Figura 6 Árvore filogenética construída com base na sequência de nucleotídeos da região 3' da ORF1 do BB-AND. Os valores de bootstrap foram obtidos pelo programa MEGA e UPGMA, com 2.000 repetições



A árvore de aminoácidos mostrou que a maioria dos isolados andinos ficaram agrupados, porém o BB-AND ficou separado dos deles (Figura 7).

Figura 7 Árvore filogenética construída com base na sequência de aminoácidos da região 3' da ORF1 do BB-AND. Os valores de bootstrap foram obtidos pelo programa MEGA e UPGMA, com 2.000 repetições



A ORF2, com 732nt, correspondente à primeira proteína do bloco triplo, a 25K, apresentou uma identidade entre 85 e 90% com os isolados Andinos do GenBank e uma identidade de 86% com o isolado de PVS^O. A identidade entre todos os isolados comuns e Andinos e o B1ScV, nessa região, foi semelhante, variando de 60 a 63% (Tabela 8).

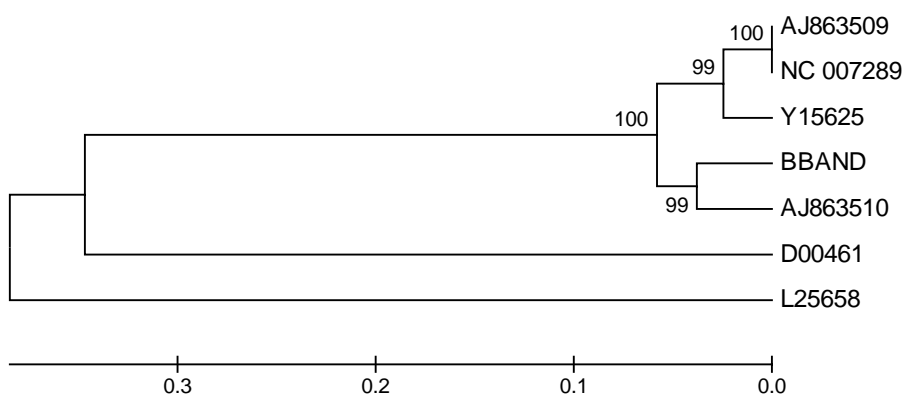
Tabela 8 Porcentagem de identidade na sequência de nucleotídeos (nt) e aminoácidos (aa) da região da ORF 2 entre o isolado BB-AND em comparação com a sequência de outros isolados de *Potato virus S* (PVS) depositados no GenBank.

nt \ aa	BB AND ¹	AJ863509 ¹	AJ863510 ¹	D00461 ¹	NC 007289 ¹	Y15625 ²	L25658 ³
BB-AND ¹		85	90	90	85	86	63
AJ863509 ¹	95		88	87	100	94	62
AJ863510 ¹	94	95		99	88	87	60
D00461 ¹	95	95	99		87	87	60
NC 007289 ¹	95	100	95	95		94	62
Y15625 ²	95	97	94	95	97		63
L25658 ³	62	62	61	61	62	60	

¹ Estirpe andina do *Potato virus S* ; ² Estirpe comum do *Potato virus S* e ³ *Blueberry scorch virus*.

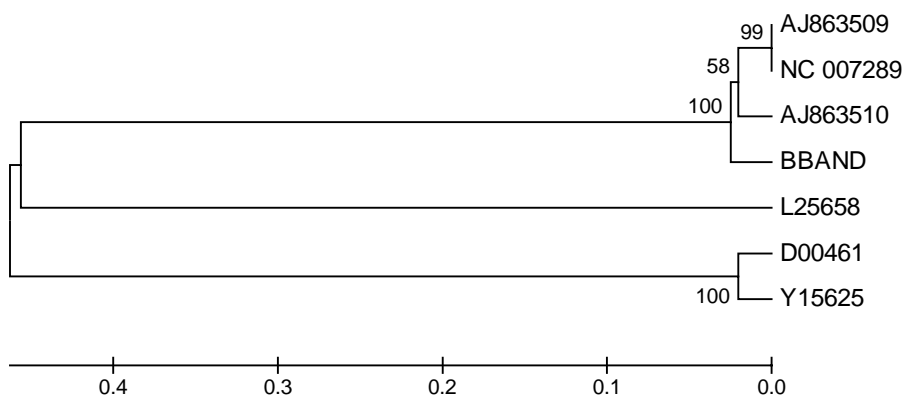
O isolado BB-AND, na árvore gerada a partir da sequência de nucleotídeos, ficou agrupado com um dos isolados andinos do banco de dados, o AJ863510, sendo que os outros ficaram em grupos separados (Figura 8).

Figura 8 Árvore filogenética construída com base na sequência de nucleotídeos da ORF2 do BB-AND. Os valores de bootstrap foram obtidos pelo programa MEGA e UPGMA, com 2.000 repetições.



Na árvore de aminoácidos, os isolados de PVS^A formaram dois grupos, sendo que o isolado de PVS^O, Y15625, se agrupou com o isolado andino D00461 (Figura 9). O BB-AND também nesta análise ficou em um subgrupo separado dos outros andinos do grupo, mostrando que também nesta região há grande variabilidade entre as sequências dos isolados andinos.

Figura 9 Árvore filogenética construída com base na sequência de aminoácidos da ORF2 do BB-AND. Os valores de bootstrap foram obtidos pelo programa MEGA e UPGMA, com 2.000 repetições.



A ORF 3, com 327 nucleotídeos, apresentou uma identidade de 83 a 89% com os demais Andinos e 83 a 85% com os isolados comuns portanto, a identidade do BB-AND com os isolados Andinos e Comuns variou entre 83 a 89% (Tabela 9).

Tabela 9 Porcentagem de identidade na sequência de nucleotídeos (nt) e aminoácidos (aa) da região da ORF 3 entre o isolado BB-AND em comparação com a sequência de outros isolados de *Potato virus S* (PVS) depositados no GenBank.

aa \ nt	BB-AND ¹	AJ863509 ¹	AJ863510 ¹	D00461 ¹	NC 007289 ¹	AJ889246 ²	DQ000234 ²	Y15625 ²	L25658 ³
	BB-AND ¹		83	89	89	83	85	84	83
AJ863509 ¹	94		84	84	100	94	94	94	68
AJ863510 ¹	98	92		100	84	84	83	83	69
D00461 ¹	98	92	100		84	84	83	83	69
NC 007289 ¹	94	100	92	92		94	94	94	74
AJ889246 ²	97	97	95	95	97		96	95	71
DQ000234 ²	96	96	94	94	96	99		96	74
Y15625 ²	96	98	94	94	98	99	98		70
L25658 ³	74	71	72	72	71	72	72	72	

¹ Estirpe andina do *Potato virus S*; ² Estirpe comum do *Potato virus S* e ³ *Blueberry scorch virus*.

Nas árvores de nucleotídeos (Figura 10) e de aminoácidos (Figura 11) o BB-AND se agrupou com os isolados de PVS^A AJ863510 e D00461 porém permanecendo ainda distanciado dos demais. Os isolados comuns formaram outro grupo, sendo esta região talvez variável entre as estirpes do vírus S porém não tanto entre isolados da mesma estirpe.

Figura 10 Árvore filogenética construída com base na sequência de nucleotídeos da ORF3 do BB-AND. Os valores de bootstrap foram obtidos pelo programa MEGA e UPGMA, com 2.000 repetições.

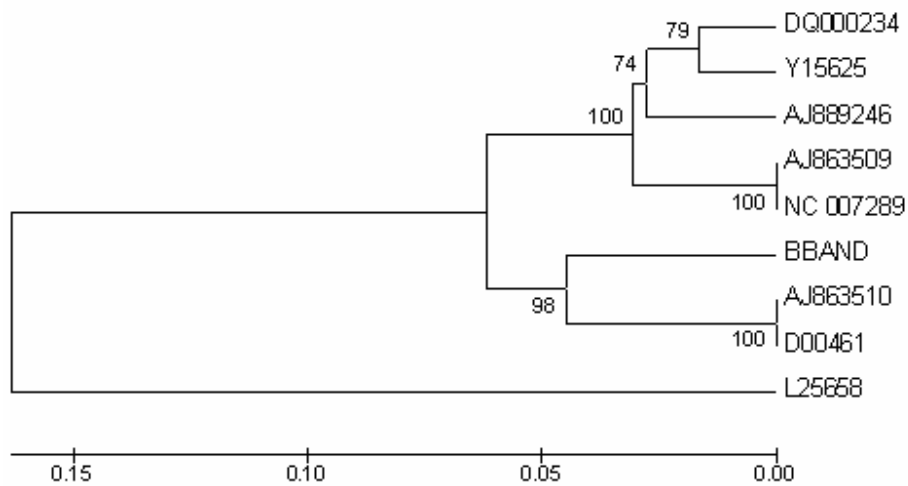
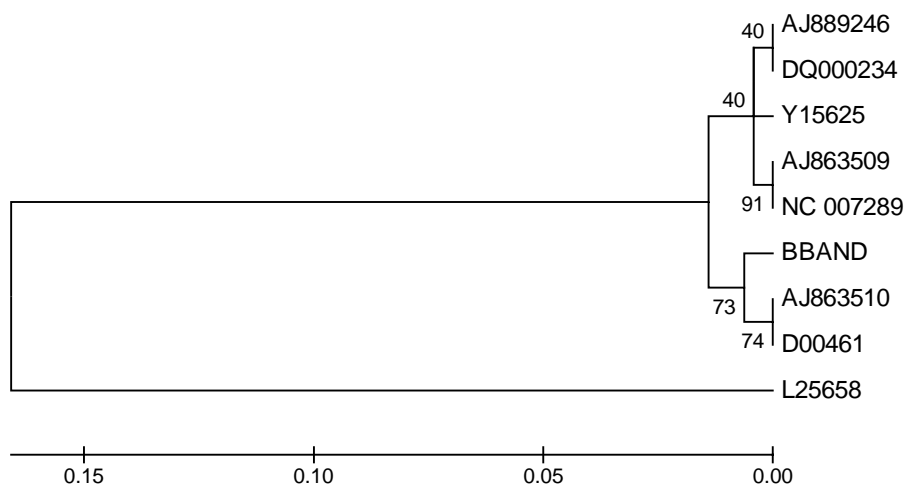


Figura 11 Árvore filogenética construída com base na sequência de aminoácidos da ORF3 do BB-AND. Os valores de bootstrap foram obtidos pelo programa MEGA e UPGMA, com 2.000 repetições.



Finalmente, o fragmento referente à última proteína do bloco triplo, a ORF 4, com 201 nucleotídeos, apresentou uma identidade de 82 a 90% com os isolados Andinos e de 81 a 84% com os isolados comuns (Tabela 10).

Tabela 10 Porcentagem de identidade na sequência de nucleotídeos (nt) e aminoácidos (aa) da região da ORF 4 entre o isolado BB-AND em comparação com a sequência de outros isolados de *Potato virus S* (PVS) depositados no GenBank.

	nt	BB-AND ¹	AJ863509 ¹	AJ863510 ¹	D00461 ¹	DQ000233 ¹	NC 007289 ¹	AJ889246 ²	DQ000234 ²	Y15625 ²
aa										
BB-AND ¹			82	90	90	82	82	84	82	81
AJ863509 ¹	90			84	84	99	100	96	97	95
AJ863510 ¹	90	86			100	84	84	86	84	83
D00461 ¹	90	86	100			84	84	86	84	83
DQ000233 ¹	90	100	86	86			99	95	97	95
NC 007289 ¹	90	100	86	86	100			96	97	95
AJ889246 ²	89	96	87	87	96	96			96	95
DQ000234 ²	90	98	86	86	98	98	98			98
Y15625 ²	87	95	83	83	95	95	95	95	96	

¹ Estirpe andina do *Potato virus S* ; ² Estirpe comum do *Potato virus S*

A análise das árvores filogenéticas geradas a partir da sequência de nucleotídeos (Figura 12) e de aminoácidos (Figura 13) mostrou a formação de um grupo com dois isolados Andinos do banco de dados, AJ863510 e D00461. O BB-AND permaneceu separado do grupo formado por isolados Andinos e do grupo dos demais isolados utilizados para comparação. Isto mostra que o BB-AND apresenta grande variação nesta região mesmo quando comparado com os demais andinos do Gen Bank.

Figura 12 Árvore filogenética construída com base na sequência de nucleotídeos da ORF4 do BB-AND. Os valores de bootstrap foram obtidos pelo programa MEGA e UPGMA, com 2.000 repetições.

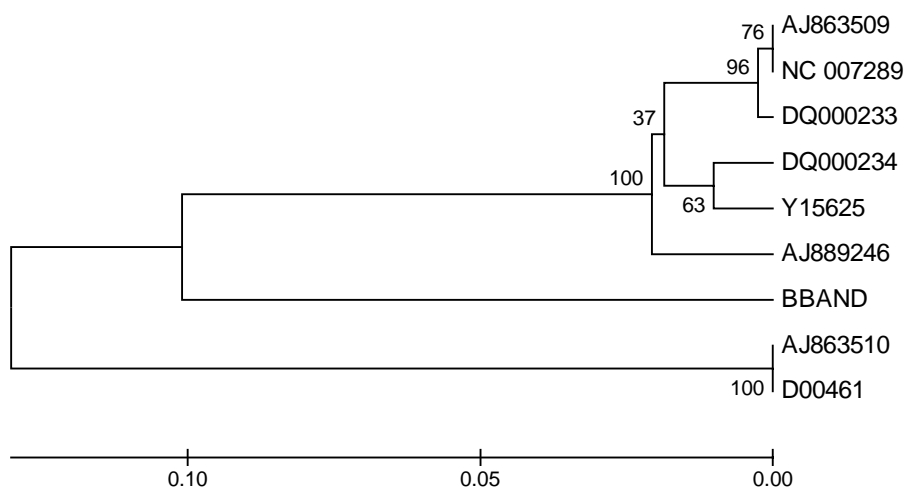
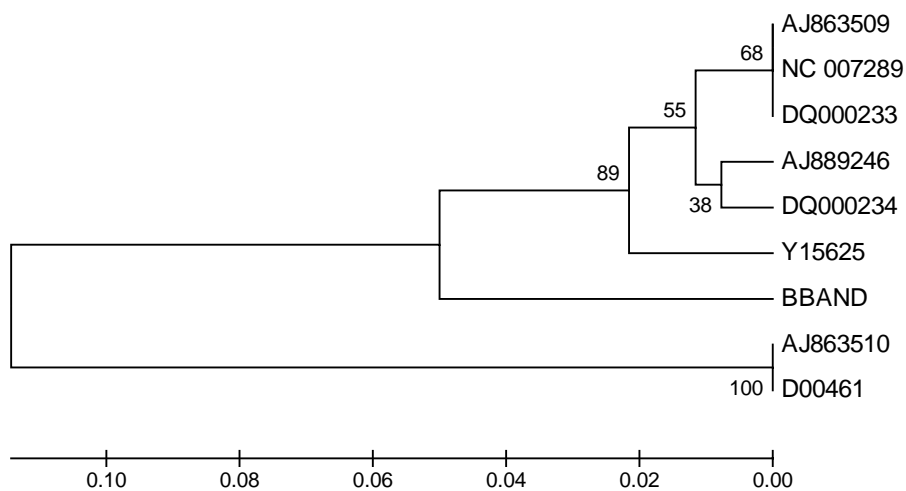


Figura 13 Árvore filogenética construída com base na sequência de aminoácidos da ORF4 do BB-AND. Os valores de bootstrap foram obtidos pelo programa MEGA e UPGMA, com 2.000 repetições.



A ORF 5, com 885 nucleotídeos, apresentou uma identidade de 79 a 88% com os isolados Andinos, e 80% a 81% com os isolados comuns. A identidade do B1ScV com os isolados andinos foi menor, 69 a 73% (Tabela 11).

Tabela 11 Porcentagem de identidade na sequência de nucleotídeos (nt) e aminoácidos (aa) da região da ORF 5 entre o isolado BB-AND em comparação com a sequência de outros isolados de *Potato virus S* (PVS) depositados no GenBank.

aa \ nt	BB AND ¹	AJ863509 ¹	AJ863510 ¹	AF493951 ¹	D00461 ¹	NC 007289 ¹	AJ889246 ²	AY512653 ³	DQ315387 ²	DQ786653 ³	U74375 ²	Y15625 ²	L25658 ³
	BB-AND ¹		79	88	84	88	79	80	80	81	81	80	81
AJ863509 ¹	92		81	81	81	100	94	98	95	93	95	95	71
AJ863510 ¹	95	93		85	100	81	82	81	87	81	81	82	69
AF493951 ¹	93	92	94		85	81	85	81	81	81	81	82	73
D00461 ¹	95	93	100	94		81	85	81	82	81	81	82	69
NC 007289 ¹	92	100	93	92	93		94	98	95	93	95	95	71
AJ889246 ²	92	96	95	94	95	96		95	95	93	93	95	71
AY512653 ³	92	97	93	93	93	96	96		95	93	95	96	71
DQ315387 ²	92	97	93	93	93	97	97	97		93	94	95	70
DQ786653 ³	92	96	93	93	93	96	97	96	96		93	93	71
U74375 ²	92	97	93	93	93	97	97	97	97	97		95	70
Y15625 ²	93	97	94	94	94	97	96	97	96	96	97		71
L25658 ³	80	80	81	81	81	80	81	80	79	79	80	81	

¹ Estirpe andina do *Potato virus S*; ² Estirpe comum do *Potato virus S* e ³ *Blueberry scorch virus*.

Os isolados de PVS^A formaram três grupos distintos nas árvores de nucleotídeos (Figura 14) e também na de aminoácidos (Figura 15). Um grupo ficou apenas os isolados AJ863510 e D00461 do banco de dados, o BB-AND ficou agrupado com um isolado da estirpe andina da Inglaterra, AF493951 e o isolado AJ863509 junto com o NC 007289 agruparam com isolados da estirpe comum do vírus S.

Figura 14 Árvore filogenética construída com base na sequência de nucleotídeos da ORF5 do BB-AND. Os valores de bootstrap foram obtidos pelo programa MEGA e UPGMA, com 2.000 repetições

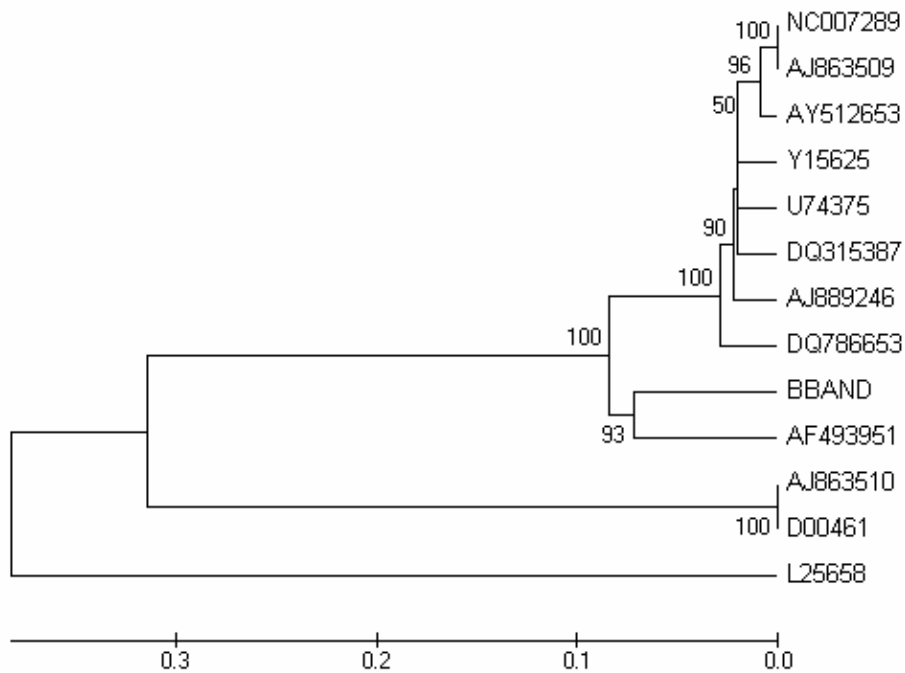
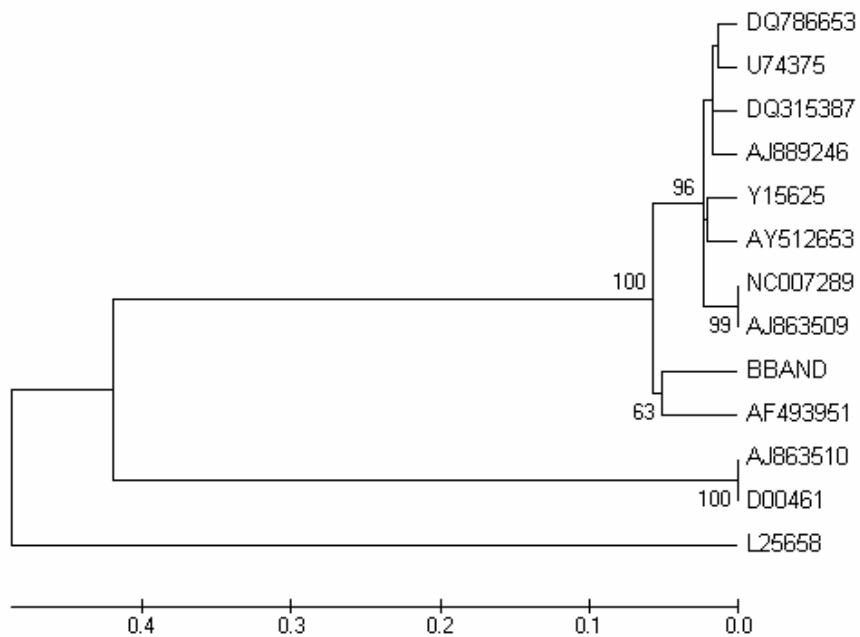


Figura 15 Árvore filogenética construída com base na sequência de aminoácidos da ORF5 do BB-AND. Os valores de bootstrap foram obtidos pelo programa MEGA e UPGMA, com 2.000 repetições



A ORF 6, referente à proteína 11K, com 285 nt, apresentou uma identidade de 81 a 89% com os isolados Andinos e de 80 a 82% com os isolados comuns, e não houve identidade entre a mesma região do B1ScV (Tabela 12).

Tabela 12 Porcentagem de identidade na sequência de nucleotídeos (nt) e aminoácidos (aa) da região da ORF 6 entre o isolado BB-AND em comparação com a sequência de outros isolados de *Potato virus S* (PVS) depositados no GenBank

nt aa	BB AND ¹	AJ863509 ¹	AJ863510 ¹	D00461 ¹	DQ000231 ¹	NC007289 ¹	AB364945 ²	AJ889246 ²	DQ000232 ²	EF397749 ²	EU433399 ²	S45593 ²	U74375 ²	Y15625 ²
	BB-AND ¹		81	89	89	81	83	82	81	80	81	80	82	81
AJ863509 ¹	84		84	84	96	100	96	96	97	99	96	97	97	96
AJ863510 ¹	87	80		100	83	84	84	83	83	82	82	84	83	83
D00461 ¹	87	80	100		83	84	84	83	83	82	82	84	84	83
DQ000231 ¹	84	95	80	80		97	98	96	97	96	95	97	96	96
NC007289 ¹	86	100	80	80	96		97	96	97	88	96	98	97	96
AB364945 ²	86	97	82	82	97	98		97	96	96	96	97	95	95
AJ889246 ²	84	95	80	80	96	96	97		96	96	95	97	95	95
DQ000232 ²	84	97	80	80	97	98	97	96		97	96	97	96	98
EF397749 ²	83	97	77	77	95	89	97	95	97		96	97	96	96
EU433399 ²	80	95	77	77	93	95	93	92	95	93		97	96	95
S45593 ²	84	97	80	80	97	98	97	96	100	97	95		97	96
U74375 ²	81	96	78	78	94	96	94	93	96	94	94	96		96
Y15625 ²	84	96	79	79	96	98	96	95	98	96	94	98	95	

¹ Estirpe andina do *Potato virus S* ; ² Estirpe comum do *Potato virus S*

Níveis semelhantes de homologia também foram observados quando as sequências de nucleotídeos da capa protéica (ORF 5) e da região 3' da ORF 6 do PVS^O e PVS^A foram comparadas. A identidade de 87% foi encontrada na análise dos nucleotídeos e na comparação dos aminoácidos as homologias foram de 93% para capa protéica e 79% para a proteína 11K (Mackenzie et al., 1989; Foster & Mills, 1992), o que mostra a variabilidade encontrada nesta região do PVS.

A árvore filogenética de nucleotídeos para a ORF 6 (Figura 16) mostrou que os isolados AJ863510 e D00461 de PVS^A do banco de dados formaram um único grupo, e que o isolado BB-AND e o NC 007289 permaneceram separado dos demais isolados do vírus S. Os isolados comuns do Gen Bank formaram outro grupo maior, sendo que o isolado da estirpe andina do vírus S AJ863509 ficou neste grupo. O mesmo foi observado na árvore de aminoácidos para esta mesma região (Figura 17).

Análises da região N-terminal da capa proteica e da proteína 11k mostraram que estas podem ser responsáveis pelas principais diferenças de sintomas e transmissão entre PVS^O e PVS^A (Mackenzie et al., 1989; Foster & Mills, 1992), porém Mackenzie & Tremaine (1990) ao introduzir o gene da capa protéica em *Nicotiana debneyii* usando *Agrobacterium tumefaciens* observaram que as plantas transgênicas que expressavam a capa protéica da estirpe Andina eram altamente resistentes à subsequente infecção por um isolado da estirpe Comum e sugeriram uma alta homologia entre os isolados de PVS^O e PVS^A.

Assim, Foster (1991) sugere que as propriedades biológicas distintas entre as duas estirpes não refletem em diferenças substanciais nas suas propriedades moleculares e degenerescências em nucleotídeos alterando os polipeptídios resultam nas diferenças entre as estirpes.

Figura 16 Árvore filogenética construída com base na sequência de nucleotídeos da ORF6 do BB-AND. Os valores de bootstrap foram obtidos pelo programa MEGA e UPGMA, com 2.000 repetições

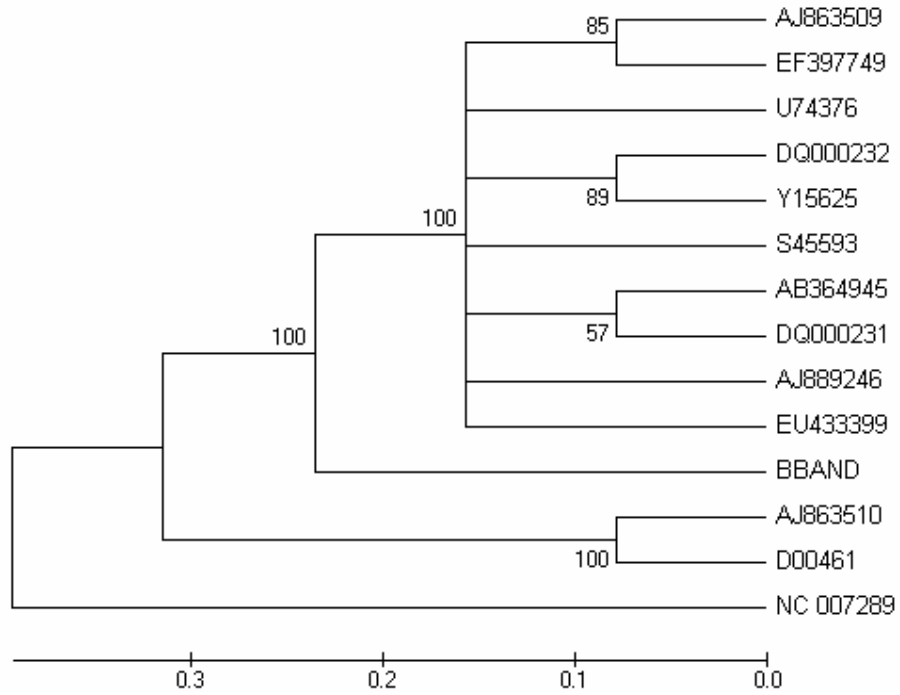
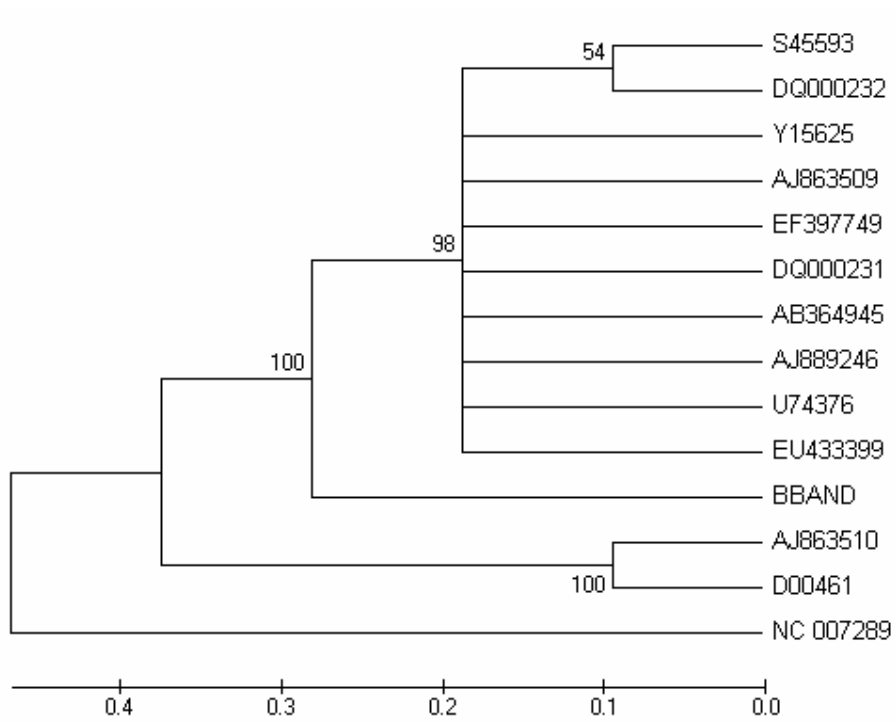


Figura 17 Árvore filogenética construída com base na sequência de aminoácidos da ORF6 do BB-AND. Os valores de bootstrap foram obtidos pelo programa MEGA e UPGMA, com 2.000 repetições



Em relação à identidade dos aminoácidos notou-se, de um modo geral, maiores identidades para a maioria dos fragmentos genômicos comparados, mostrando que as mutações ocorridas na sequência de nucleotídeos não corresponderam à variação nos aminoácidos, ou seja, foi uma substituição não sinônima ou silenciosa (Nei & Gojobori, 1986). Isso não ocorreu na primeira parte da RdRp, na qual a identidade do BB-AND com os isolados Andinos ficou entre 73 e 88%, semelhante aos valores observados para os nucleotídeos. Já a região N terminal desta mesma proteína, a identidade foi maior, apresentando uma variação de 91% a 96%. O mesmo foi observado em outras ORFs como a ORF 2, que mostrou identidades de 94 e 95% com os Andinos, a ORF 3, com identidades de 94 e 98%, a ORF 4, com identidade iguais a 80 e 90%, a ORF 5, com identidades de 92 a 95% e a ORF 6 entre 84 e 87%.

Considerando-se as árvores filogenéticas, baseadas na sequência de nucleotídeos de cada ORF, separadamente, os agrupamentos diferiram de uma para outra. Assim nas árvores baseadas nas sequências de cada uma das ORFs 2 a 5, o AJ863509 se agrupou com o isolado de PVS^A, NC007289, apenas na ORF 6 este isolado do PVS^A ficou separado dos demais, enquanto que o BB-AND ora se agrupou com o AJ863510 nas ORFs 2 e 3, ou separado dos demais nas ORFs 4 e 6 ou agrupado com o isolado da estirpe andina da Inglaterra na ORF 5.

Nas árvores baseadas nas sequências de aminoácidos notou-se também a mesma variabilidade, com o BB-AND se agrupando ora com um ou outro isolado da estirpe Andina, ou ficando separado, mostrando uma clara distinção entre os isolados Andinos disponíveis no GenBank e o BB-AND.

Como os demais isolados foram detectados e estudados em países europeus, é possível que eles tenham evoluído em outra direção, devido a efeitos de fatores intrínsecos, como clima e cultivares de batata.

4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, M. J.; ANTONIW, J. F.; BAR-JOSEPH, M.; BRUNT, A. A.; CANDRESS, T.; FOSTER, G. D.; MARTELLI, G. P.; MILENE, R. G.; ZAVRIEV, S. K.; FAUQUET, C. M. The new plant virus family *Flexiviridae* and assessment of molecular criteria for species demarcation. **Archives of Virology**, New York, v.149, n. 8, p.1045-1060, Aug. 2004.

AUSTRALIAN FOOD AND GROCERY COUNCIL. **Protocols**, August, 2002. Disponível em: <<http://www.arabdopsis.org/portals/masc/AFGC/RevisedAFGC/site2RnaL.htm#isolation>>. Acesso em: 10 set. 2006.

BAGNALL, R. H. Potato virus S. In: HOOKER, W. J. (Ed.) **Compendium of potato diseases**. St. Paul: American Phytopathological Society, 1981. p. 75-77.

BOONHAM, N.; WALSH, K.; SMITH, P.; MADAGAN, K.; GRAHAM, I.; BARKER, I. Detection of potato viruses using microarray technology : towards a generic method for plant viral disease diagnosis. **Journal of Virological Methods**, Amsterdam, v.108, n. 2, p. 181-187, 2003.

CENTER FOR EVOLUTIONARY FUNCTIONAL GENOMICS. **MEGA 4.0**: Molecular Evolutionary Genetics Analysis. Disponível em: <<http://www.megasoftware.net>>. Acesso em: 20 dez. 2008.

CHANG, S.; PURYEAR, J.; CAIRNEY, J. A simple and efficient method for isolating RNA from pine trees. **Plant Molecular Biology Reporter**, Athens v. 11, n. 2, p. 113-116, June 1993.

CHIKH, M.; MAOKA, T.; NATSUAKI, K. T. The occurrence of potato viruses in Syria and the molecular detection and characterization of Syrian *Potato virus S* isolates. **Potato Research**, Wageningen, v.51, n. 2, p. 151-161, June 2008.

COSTA, A. S. Moléstias de vírus da batata. **Boletim do Campo**, Campinas, v. 190, n. 20, p.68-83, 1965.

CUPERTINO, F. P.; OLIVEIRA, A. R.; COSTA, A. S. Presença do vírus S em batata-semente nacional e estrangeira. **Bragantia**, Campinas, v. 29, n. 1, p. 17-20, jan. 1970.

DANIELS, J.; SILVA, A. C. F.; SOUZA, Z. S.; SCHONS, J. Degenerescência de batata-semente básica após um ou dois períodos de cultivo. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 20, n. 3, p. 510-513, set. 2002.

DE BOKX, J. A. Reactions of various plant species to inoculation with potato virus S. **Journal Plant Pathology**, Netherlands, v. 76, n. 2, p. 70-78, Mar.1970.

DOLBY, C. A.; JONES, R. A. C. Occurrence of the Andean strain of *Potato virus S* in imported potato material and its effects on potato cultivars. **Plant Pathology**, Oxford, v. 36, n. 3, p. 381-388, Sept. 1987.

EUROPEAN BIOINFORMATICS INSTITUTE. **CLUSTALW. Multiple Sequence Alignment**. Disponível em: <<http://clustalw.genome.jp>>. Acesso em: 20 dez. 2008.

FIGUEIRA, A.R.; RIBEIRO, S. R. R. P.; CAMARGOS, V. N.; GOMES, E. A.; FERREIRA, A. A.; GERALDINO, P. S. Estipe andina do potato vírus S detectada no Brasil é semelhante ao isolado andinho da Colombia. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v. 33, p.298, Ago. 2008. Suplemento.

FLETCHER, J. D. *Potato virus S^A*: characteristics of an isolate from New Zealand. **New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science**, Christchurch, v. 24, n. 4, p. 335-339, Dec. 1996.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **Database collection**: agricultural data. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/site/526/default.aspx>>. Acesso em: 22 dez. 2008.

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

FOSTER, G. D.; MILLS, P. R. The 3'-nucleotide sequence of an ordinary strain of *Potato virus S*. **Virus Genes**, Norwell, v. 6, n. 3, p. 213-220, Aug. 1992.

FOSTER, G.D. Molecular variation between ordinary and Andean strains of potato virus S. **Research in Virology**, Paris, v. 142, n. 5, p.413-416, Sept./Oct.1991.

FOSTER, G.D. The structure and expression of the genome of *Carlavirus*. **Research in Virology**, Paris, v. 143, n. 2, p. 103-112, Mar./Apr.1992. Mini-review.

GERALDINO, P. S.; BARBOSA, C. R.; FIGUEIRA, A. R. Incidência de vírus em batata semente no estado de Minas Gerais. In: CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UFLA-CIUFLA, 11; SEMINÁRIO DE AVALIAÇÃO DO PIBIB/CNPQ, 11; SEMINÁRIO DE AVALIAÇÃO DO PIBIC/FAPEMIG, 11., LAVRAS, 2006 . **Resumo**.... Lavras: UFLA, 2006. v. 1, p. 306-306.

HELDAK, J. Detection of *Potato virus S* by RT-PCR in potato regenerants derived from *in vitro* heat-treated shoot tips. **Acta Fytotechnica et Zootechnica**, Slovak Republic, v. 4, p. 275-277, June 2001.

HINOSTROZA-ORIHUELA, A.M. Some proprieties of *Potato virus S* isolated from Peruvian potato varieties. **Potato Research**, Netherlands, v. 16, n. 3 p. 244-250. Sept. 1973.

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

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Indicadores** : agropecuária. Disponível em:
<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/lspa_200809_5.shtm>. Acesso em: 13 dez. 2008.

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

KOSTIW, M. The effect of feeding time on potato virus S transmission by *Myzus persicae* (Sulz.) and *Aphis nasturtii* Kalt, aphids. **Potato Research**, Wageningen, v. 46, n. 3-4, p. 129-136, Sept. 2004.

KOSTIW, M. Transmission of potato virus S by *A. nasturtii* Kalt. **Potato Research**, Wageningen, v. 18, n. 4, p. 641-643, Dec.1975.

LAWRENCE, D. M.; ROZANOV, M. N.; HILLMAN, B. I. Autocatalytic processing of the 223-kDa protein of blueberry scorch carlavirus by a papain-like proteinase **Virology**, New York, v. 207, n. 1, p. 127-135, Feb. 1995.

MACKENZIE, D. J. TREMAINE J. H., STACE-SMITH, R. Organization and intervirial homologies of the 3'-terminal portion of *Potato virus S* RNA. **Journal of General Virology**, London, v. 70, n. 5, p. 1053-1063, May 1989.

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

MANZER, F. E.; MERRIAN, D. C.; HELPER, P. R. Effects of potato virus S and two strains of potato virus X on yields of russet Burbank, Kennebec, and Katahdin cultivars in Maine. **American Potato Journal**, New York, v. 55, n. 11, p. 601-609, Nov. 1978.

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

MONIS, J.; ZOETEN, G. A. Molecular cloning and physical mapping of potato virus S complementary DNA. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 80, n. 5, p. 446-450, May 1990.

NATIONAL CENTRE FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. **BLAST Basic Local Alignment Search Tool**. 2008. Disponível em: <<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>>. Acesso em: 20 dez. 2008.

NEI, M.; GOJOBORI, T. Simple methods for estimating the numbers of synonymous and nonsynonymous nucleotide substitutions. **Molecular Biology and Evolution**, Oxford, v. 3, n. 5, p. 418-426, Sept. 1986.

RIBEIRO, S. R. 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, MG.

RIBEIRO, S. R. R. P.; FIGUEIRA, A. R. Detection of Andean strain of *Potato virus S* in Brazil. **Associação da Batata Brasileira**. Disponível em: <http://www.abbatatabrasileira.com.br/batatashow4/resumos/resumo_36.pdf>. Acesso em: 20 nov. 2008.

RIBEIRO, S. R. R. P.; FIGUEIRA, A. R.; GERALDINO, P. S.; GALVINO, S. B. F.; RAMALHO, T. O. Sintomas provocados pelo *Potato Virus S* (PVS) em plantas de batata em infecções simples e mistas. **Associação da Batata Brasileira**. Disponível em: <http://www.abbatatabrasileira.com.br/batatashow4/resumos/resumo_37.pdf>. Acesso em: 20 nov. 2008.

- ROSE, D. G. Some properties of an unusual isolate of potato virus S. **Potato Research**, Wageningen, v. 26, n. 1, p. 49-62, Mar. 1983.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning : a laboratory manual**. 2. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989. v. 3, 253 p.
- SILBERSCHIMIDT, K. M. A degenerescência da batatinha. **O Biológico**, São Paulo, v. 3, n. 9, p. 247-255, 1937.
- SILBERSCHIMIDT, K. M.; KRAMER, M. O vírus Y, uma das principais causas da degenerescência das batatinhas no Estado de São Paulo. **O Biológico**, São Paulo, v. 3, n.2, p.39-47, 1942.
- SILBERSCHIMIDT, K. M. Potato viruses in the Americas. **Phytopathology**, Saint Paul, n. 44, p. 415-420, 1954.
- SLACK, S. A. Identification of an isolate of the Andean strain of *Potato virus S* in North America. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 67, n. 7, p. 786-789, Aug. 1983.
- SOUZA DIAS, J. A. C. Viroses da batata e suas implicações na produção de batata-semente no Estado de São Paulo. **Summa Phytopathologica**, São Paulo, v. 21, n. 3-4, p. 264 – 266, 1995.
- WARDROP, E. A.; GRAY, A. B.; SINGH, R. P.; PETERSON, J. F. Aphid transmission of *Potato virus S*. **American Potato Journal**, New York, v. 66, n. 8, p. 449-459, Aug 1989.
- WETTER, C. **Description of plant viruses : *Potato virus S***. Surrey, England: Mycology Institute/Association Applied Biologists, 1971. 60 p.
- WRIGHT, N. S.; MACCARTHY, H. R.; FORBES A. R. Epidemiology of potato leafroll virus in the Fraser River delta of British Columbia. **American Journal of Potato Research**, Orono, v. 47, n. 1, p. 1-8, Jan. 1970.
- WRIGHT, N. S. The effect of separate infections by potato viruses X and S on Netted Gem potato. **American Journal of Potato Research**, Orono, v. 54, n. 4, p. 147-149, Apr. 1977.