

**CARACTERIZAÇÃO PATOGÊNICA E
MOLECULAR DE ISOLADOS DO *Potato virus*
Y (PVY) CAUSADORES DE ANÉIS
NECRÓTICOS EM TUBÉRCULOS DE
BATATA**

VALQUÍRIA NOGUEIRA CAMARGOS

2009

VALQUÍRIA NOGUEIRA CAMARGOS

**CARACTERIZAÇÃO PATOGÊNICA E MOLECULAR DE ISOLADOS
DO *Potato virus Y* (PVY) CAUSADORES DE ANÉIS NECRÓTICOS EM
TUBÉRCULOS DE BATATA**

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

Orientadora
Profa. Dr.^a. Antônia dos Reis Figueira

**LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL
2009**

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

Camargos, Valquíria Nogueira.

Caracterização patogênica e molecular de isolados do *Potato virus Y* (PVY) causadores de anéis necróticos em tubérculos de batata / Valquíria Nogueira Camargos. – Lavras: UFLA, 2009.

58 p.: il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2009.

Orientador: Antônia dos Reis Figueira.

Bibliografia.

1. PVY^{NTN}. 2. Batata. 3. RT-PCR. 4. Hospedeiras. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 635.2198

VALQUÍRIA NOGUEIRA CAMARGOS

**CARACTERIZAÇÃO PATOGÊNICA E MOLECULAR DE ISOLADOS
DO *Potato virus Y* (PVY) CAUSADORES DE ANÉIS NECRÓTICOS EM
TUBÉRCULOS DE BATATA**

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

APROVADA em 18 de fevereiro de 2009

Dr. Hugo Adelande Mesquita

EPAMIG

Prof. Dr. Mário Lúcio Vilela de Resende

UFLA

Profª. D^{ra}. Antônia dos Reis Figueira
(Orientadora)

**LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL
2009**

A Deus,
Por me conceder a vida

OFEREÇO.

Aos meus pais, Valdir e Luzia, pelo exemplo de amor mais sincero,
carinho e compreensão.

A minha irmã e meu sobrinho Rodrigo, pelo companheirismo e amizade.
A meu amor Jefferson, pelo amor, apoio incondicional, compreensão, paciência
e incentivo.

DEDICO.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Lavras e à Coordenação do Programa de Pós Graduação em Fitopatologia, pela oportunidade de realizar o mestrado.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudos.

A Fundação de Apoio a Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG) pela concessão da bolsa de apoio técnico BATII.

A minha querida orientadora, Profa. D^{ra}. Antonia dos Reis Figueira, por quem tenho imensa admiração, MUITO OBRIGADA pela orientação, apoio, incentivo, no decorrer deste trabalho.

Ao Dr. Renato Braga Diretor, Comercial da Sakata Seed Sudamerica, pelas sementes de pimentão cedidas.

Aos professores do Departamento de Fitopatologia, pelos ensinamentos e experiências, muito importantes na minha formação profissional.

A todos os funcionários do Departamento de Fitopatologia, em especial a Ângela, Cláudio, Edinho, Bruno e Ruth, pela ajuda no decorrer do curso.

Aos amigos, Jadir, Daniel, João de Cássia, Hermínio, Daniela, Douglas, Vanessa, Dejânia, André, Rosana, Marcos Freitas, Carol, Juscilaine e Fernanda pela amizade e ajuda no decorrer do curso.

Aos amigos da Virologia, Alessandra, João, Cleiton, Thaís, Samuel, Francisco, Rejane, Jaciara, Márcia em especial a Silvia, Charles, Suellen, Carzinho Luciene e Priscilla, MUITO OBRIGADA A TODOS.

Aos meus pais Luzia e Valdir, ao meu namorado Jefferson, minha irmã Gisele pelo amor, paciência e por estarem sempre me apoiando nas decisões importantes.

E a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho, agradeço.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	i
LISTA DE QUADROS	iii
LISTA DE TABELAS.....	iv
RESUMO.....	v
ABSTRACT	vii
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 MATERIAL E MÉTODOS	4
2.1 Isolados	4
2.2 Identificação e manutenção do inóculo viral	5
2.3 Inoculação dos isolados de PVY ^{NTN} em plantas indicadoras.....	6
2.4 Caracterização sorologia DAS-ELISA	6
2.5 Extração do RNA (total)	7
2.6 RT-PCR e sequenciamento do cDNA.....	8
2.7 Análise filogenética	10
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	11
3.1 Caracterização biológica dos isolados de PVY ^{NTN}	11
3.2 Caracterização molecular dos isolados de PVY ^{NTN}	17
4 CONCLUSÕES.....	30
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	31
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	32
7 ANEXOS.....	39

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1 Mapa do Estado de Minas Gerais e São Paulo indicando as regiões nas quais foram coletados os catorze isolados de *Potato virus Y* (PVY^{NTN}).....5
- FIGURA 2 Sintomas induzidos por três isolados de PVY^{NTN} em quatro cultivares de fumo. A - White Burley; B - *Nicotiana glutinosa*; C - Turkish; D - Turkish NN. 1 - Sadia; 2 - AN-AGA; 3 - IP - MON; 4 - MU-AGA. 15
- FIGURA 3 Folhas de *Capsicum annuum* cv. Yolo Y, com diferentes intensidades de sintomas de mosaico causados por isolados de PVY. A- Sadia; B: LA-MON (mosaicos leves); C: MU-AGA (mosaico severo). 31
- FIGURA 4 Análise eletroforética em gel de agarose dos produtos da PCR. M = 1Kb ladder; 1 - PVY^N; de 2 a 15 isolados de PVY^{NTN}, bandas obtidas com os primers desenhados por Boonham et al. (2002b), sendo: 2 - AN-AGA; 3 - BR-AGA; 4 - ES-AGA; 5 - GO-AST; 6 - IP - MAR; 7 - IP-MON; 8 - LA-MON; 9 - MF-AST; 10 - MU-AGA; 11 - PA-AGA1; 12 - PA-AGA2; 13 - SA-AST; 14 - SGS-MO e 15 - SP- MO. 32
- FIGURA 5 Análise eletroforética em gel de agarose dos produtos da PCR. M = 1Kb ladder; 1 - PVY^N; 2 - PVY^{NTN}, bandas obtidas com os primers desenhados por Boonham et al. (2002b), as bandas de 3 a 16 com os primers desenhados para *Potato virus Y*, abordando o gene da capa protéica sendo: 3 - AN-AGA; 4 - BR-AGA; 5 - ES-AGA; 6 - GO-AST; 7 - IP - MAR; 8 - IP-MON; 9 - LA-MON; 10 - MF-AST; 11 - MU-AGA; 12 - PA-AGA1; 13 - PA-AGA2; 14 - SA-AST; 15 - SGS-MO e 16 - SP- MO..... 33

- FIGURA 6 Árvore filogenética obtida com base na sequência de nucleotídeos dos isolados brasileiros de PVY^{NTN}. Os valores do bootstrap foram obtidos pelo programa MEGA, UPGMA, com 2.000 repetições...24
- FIGURA 7 Árvore filogenética obtida com base nas sequências de aminoácidos dos isolados brasileiros de PVY^{NTN}. Os valores de bootstrap foram obtidos pelo programa Neighbor Joining, com 2.000 repetições...25
- FIGURA 8 Árvore filogenética obtida com base nas sequências de nucleotídeos dos isolados brasileiros de PVY^{NTN} comparados com os isolados disponíveis no GenBank. Os valores de bootstrap foram obtidos pelo programa MEGA, UPGMA, com 2.000 repetições.28
- FIGURA 9 Árvore filogenética obtida com base nas sequências de aminoácidos dos isolados brasileiros de PVY^{NTN} comparados com os isolados disponíveis no GenBank. Os valores de bootstrap foram obtidos pelo programa Neighbor Joining, com 2.000 repetições.....29

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1	Isolados de PVY ^{NTN} coletados no Brasil.	4
QUADRO 2	Espécies de plantas hospedeiras inoculadas com os diferentes isolados de PVY ^{NTN}	7
QUADRO 3	Relação dos isolados de <i>Potato virus Y</i> (PVY) disponíveis no GenBank, empregados para comparação das sequências genéticas com as sequências dos isolados estudados.	10
QUADRO 4	Sintomas apresentado pelas espécies de plantas inoculadas mecanicamente com sete isolados de PVY ^{NTN} , no período de maio a julho e de setembro a novembro/2007*.	13
QUADRO 5	Sintomas apresentado pelas espécies de plantas inoculadas mecanicamente com sete isolados de PVY ^{NTN} , no período de maio a julho e de setembro a novembro/2007*.	14

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 Primers usados na detecção e discriminação da variante de PVY ^{NTN} e na amplificação da capa protéica.....	9
TABELA 2 Porcentagem de identidade na sequência de nucleotídeos do gene da capa protéica entre os catorze isolados estudados em comparação com a sequência de outros dezesseis isolados de PVY depositados no GenBank.....	20
TABELA 3 Porcentagem de identidade na sequência de aminoácidos do gene da capa protéica entre os catorze isolados estudados em comparação com a sequência de outros dezesseis isolados de PVY depositados no GenBank.....	23

RESUMO

CAMARGOS, Valquíria Nogueira. **Caracterização patogênica e molecular de isolados do *Potato virus Y* (PVY) causadores de anéis necróticos em tubérculos de batata.** 2009. 58 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.*

Foram coletados e estudados catorze isolados de PVY^{NTN} em campos de produção de batata para consumo do Brasil, sendo treze deles provenientes da região Sul do Estado de Minas Gerais e um do Estado de São Paulo. Esses isolados foram submetidos ao teste DAS-ELISA e a RT-PCR, para identificação inicial, sendo em seguida inoculados em catorze espécies de hospedeiras para avaliação de sintomas. Além disso, um fragmento genômico de 866 pb contendo o gene da capa protéica foi amplificado, seqüenciado e analisado, fazendo-se a comparação entre os isolados e entre esses e outros 16 isolados de PVY do “GenBank”, sendo que quatro deles descritos como PVY^N e os restantes como PVY^{NTN}. Todos os isolados estudados foram ELISA positivos, na identificação por RT-PCR, a discriminação entre isolados do tipo PVY^N e PVY^{NTN} foi melhor sucedida quando empregada uma mistura de primers, obtendo-se uma banda de 280pb para o primeiro e uma banda de 609 pb para o segundo. As plantas de *C. quinoa*, *C. amaranticolor*, *D. stramonium* e *G. globosa* e *Capsicum anuum* cv. Florida VR2, não apresentaram sintomas quando inoculados com todos os isolados e foram também ELISA negativos. As de *Capsicum anuum* cvs. Yolo Y e Bastidon apresentaram sintomas de mosaico, cuja severidade variou com o isolado. As plantas de fumo cvs. White Burley, Turkish e Turkish NN, foram altamente suscetíveis e reagiram com sintomas de mosaico severo, necrose das nervuras, lesão necrótica local, distorção foliar, encarquilhamento e subdesenvolvimento. Entretanto, esses sintomas foram mais severos com os isolados MF-AST, MUZ-AGA, PA-AGA2, e SP-MON, menos severos para os AN-AGA, ES-AGA, LA-MON e GO-AST, sendo que os demais apresentaram sintomas intermediários. Elas foram consideradas as melhores diferenciadoras, pela clara distinção de sintomas entre os isolados. No alinhamento de nucleotídeos, observou-se que a identidade entre os isolados estudados variou entre 93% e 100%, enquanto que a identidade de aminoácidos variou de 90 a 100%. Na comparação entre esses e os demais isolados do GenBank, a identidade de nucleotídeos variou entre 92 a 99% e de aminoácidos de 90 a 99%, mostrando uma baixa variabilidade entre eles. Quando se analisaram ambas as árvores filogenéticas, construídas com base na seqüência de nucleotídeos e

*Orientadora: Prof^ª. D^{ra}. Antônia dos Reis Figueira - UFLA

aminoácidos, notou-se que o isolado que apresentou as menores identidades (SGS-MO) com todos os demais, ficou separado, formando um subgrupo isolado. O isolado MU-AGA, em ambas as árvores, se agrupou com o isolado AJ390296, dos Estados Unidos, indicando uma provável origem geográfica comum. Os demais apresentaram uma maior proximidade, com exceção do IP-MAR, BR-AGA e LA-MON. Os isolados que causaram sintomas mais severos em plantas de fumo se agruparam com os que causaram sintomas fracos ou intermediários, indicando que, provavelmente, a sequência genômica da capa protéica não está relacionada com a severidade dos sintomas induzidos nas plantas hospedeiras.

ABSTRACT

CAMARGOS, Valquíria Nogueira. **Characterization pathogenic and molecular the isolates of *Potato virus Y* (PVY) causes of rings necrotics in tuber potato.** 2009. 58 p. Dissertation (Master Program in Phythopathology) - Federal University of Lavras, Lavras, MG.*

Fourteen isolates of PVY^{NTN} were collected and studied at potato production fields for consumption in Brazil. Thirteen isolates were from South Minas Gerais and one of them from São Paulo State. All isolates were submitted to DAS-ELISA and RT-PCR, for initial identification. After that, they were inoculated in fourteen host species for symptom evaluation. In addition, a genomic fragment of 866 bp containing coat protein gene was amplified, sequenced and analyzed. A comparative study was performed with Brazilian isolates and with other 16 isolates of PVY from the GenBank. Four of them were described as PVY^N and the others as PVY^{NTN}. All isolates studied were positive for ELISA. In the identification for RT-PCR, the discrimination among type PVY^N and PVY^{NTN} isolates was successfully achieved when a mixture of primers was used. Therefore, one 280 bp band for the first and the other 609 bp band for the second were obtained. The plants of *C. quinoa*, *C. amaranticolor*, *D. stramonium* and *G. globosa* and *Capsicum anuum* cv. Flowered VR 2 did not present symptoms when inoculated with all isolates and they were also negative for ELISA. The *Capsicum anuum* cvs. Yolo Y and Bastidon plants presented mosaic symptoms but the severity varied within isolates. Tobacco plants cvs. White Burley, Turkish and Turkish NN, were highly susceptible and reacted with severe mosaic symptoms, vein necrosis, necrotic local lesion, leaf distortion, shriveling and stunting. However, those symptoms were more severe with isolates MF-AST, MUZ-AGA, PA-AGA2, and SP-MON and less severe for AN-AGA, ES-AGA, LA-MON and GO-AST, and the others presented intermediate symptoms. These plants were considered the best differential hosts, for the distinction of symptoms among the isolates. From the nucleotide alignment, the identity among the isolates studied varied from 93% to 100%, while the identity of amino acids varied from 90 to 100%. In the comparison between those and the other isolates from GenBank, the nucleotide identity varied among 92 to 99% and of amino acids from 90 to 99%. It showed a low variability among them. When both phylogenetic trees were analyzed, based on the nucleotides sequence and amino acids was interesting to notice that the isolate (SGS-MO) presented the smallest identities. Therefore, this isolate had

*Advisor: Antônia dos Reis Figueira - UFLA.

clustered an independent subgroup. The isolate MU-AGA, in both trees, grouped with isolated AJ390296, of the United States, indicating a probable common geographical origin. The others presented a larger proximity, except for the IP-MAR, BR-AGA and LA-MON. The isolates that caused more severe symptoms in tobacco plants were grouped with the ones that caused weak symptoms. It indicates that probably the coat protein genomic sequence is not related to the severity of symptoms induced in the host plants.

1 INTRODUÇÃO

A batata (*Solanum tuberosum* L.) é uma espécie originária dos Andes onde é cultivada a mais de 7.000 anos (Marouelli & Guimarães, 2006). Atualmente é considerado um alimento popular, ocupando o quarto lugar na alimentação mundial, perdendo apenas para o trigo, o arroz e o milho. Devido ao seu papel na nutrição humana, como fonte de proteínas, vitaminas, sais minerais e aminoácidos, tem seu lugar no agronegócio mundial, onde o maior produtor em 2007 foi a China, com mais de 72 milhões de toneladas, seguido pela Rússia com 36 milhões de toneladas e a Índia, com a produção anual de aproximadamente 26 milhões de toneladas (Pereira et al., 2005; FAO, 2009).

No Brasil essa hortaliça foi introduzida no final do século XIX, por imigrantes europeus, e atualmente vem sendo muito cultivada, com uma área de aproximadamente 144 mil hectares e uma produção de mais de três milhões de toneladas. As regiões sudeste e sul são as principais produtoras, sendo que o estado de Minas Gerais por vários anos consecutivos vem ocupando a liderança nacional, com 1.204,205 toneladas; em segundo lugar o estado de São Paulo, com 750.000 toneladas; em terceiro o Paraná, com mais de 659.000 toneladas e em quarto o Rio Grande do Sul, com pouco mais de 385.000 toneladas. Finalmente, Goiás ocupa o quinto lugar com cerca de 186.000 toneladas e a Bahia o quinto, com cerca de 291.000 toneladas (Agrianual, 2009). No entanto, diversos fatores podem afetar a produção no mercado nacional. Dentre eles, destacam-se as infecções de natureza virótica que, além de não possuir controle curativo, causa a degenerescência da batata semente e diminui a produtividade e o vigor, após poucas multiplicações dos tubérculos no campo (Costa, 1965; Peters & Jonis, 1981; Andrade & Figueira, 1991).

Entre os vírus que afetam a cultura da batata, o *Potato virus Y* (PVY) vem se destacando como um dos mais importantes patógenos, com perdas que

variam de 10 a 80%, de acordo com a estirpe ou variante desse vírus (Shukla et al., 1984; Ávila et al., 2007). Além de infectar uma ampla gama de hospedeiras da família solanaceae, esse vírus pode ser transmitido por afídeos, como *Myzus persicae*, de forma não persistente (Costa, 1965; De Box & Huttinga, 1981; Salas & Feres, 2004).

Espécies do gênero *Potyvirus* possuem partículas filamentosas de 700 a 750 nm de comprimento, contendo uma única fita de RNA positiva com cerca de 10 Kb, com uma proteína VPg ligada covalentemente ao terminal 5' e uma cauda poli A na extremidade 3'. Possui apenas uma ORF que é clivada, após a tradução, por três proteases (P1, HC-Pro e NIa), presentes em sua própria sequência, originando dez proteínas funcionais: P1, HC-Pro, P3, 6K₁, 6K₂, NIa-VPg, NIa-Pro, NIb, CP (Dougherty & Carrington, 1988; Murphu et al., 1995).

Três grupos distintos de estirpes têm sido definidos, de acordo com a sintomatologia induzida em fumo e batata. Neles se incluem: o PVY^O que causa mosaico sistêmico em folhas de fumo, PVY^N, causador do sintoma de necrose nas folhas de fumo e o PVY^C que induz um sintoma do tipo “Stipple Streak” em algumas cultivares de batata que possuem o gene Nc (De Box & Huttinga, 1981). No entanto, nos últimos anos outras variantes da estirpe necrótica e comum foram identificadas. Uma variante da PVY^N, denominada de PVY^{NTN}, por causar anéis necróticos nos tubérculos (PTNRD - Potato tuber necrotic ringspot), foi descrita pela primeira vez na Hungria por Beczer et al. (1984). A partir de então, disseminou-se para regiões produtoras de batata de diversos países como: Alemanha, Tchecoslováquia, Yugoslávia, Áustria, Líbano, Dinamarca, França, Bélgica, Estados Unidos e Japão (Weedemann, 1985; Dedic & Ptáček, 1999; Buturovic & Kus, 1990; Schiessendoppler, 1990; Le Romancer & Kerlan, 1991; Nielsen, 1992; Le Romancer et al., 1994; Beczner et al., 1984; Singh, 1998; Ohshima et al., 2000). No Brasil, foi detectada pela primeira vez por Souza-Dias (1996) e notificada pelo Ministério da Agricultura em 1997.

Estudos com a PVY^{NTN} têm indicado que ela é uma sub-estirpe derivada de combinações entre a PVY^O e a PVY^N e apresenta três pontos de recombinação: HC-Pro/P3/CI/6K₁, 6K₂/NIa e CP/3'NTR (Glais et al., 2002). A sua diagnose visual com base nos sintomas induzidos nas plantas hospedeiras é praticamente impossível, pois os sintomas podem variar com o ambiente, a hospedeira, a estirpe e até o isolado viral. Assim sendo, essa discriminação somente é possível por meio de anticorpos monoclonais, específicos para cada estirpe (Gurgeli & Fries, 1983), ou ainda por RT-PCR. (Singh, 1998; Weilguny & Singh, 1998; Boonham et al., 2002a; Boonham et al., 2002b; Lorenzen et al., 2006).

Embora Le Romancer et al. (1994), tenha obtido sucesso com a caracterização biológica para diferenciação de isolados de PVY^{NTN}, somente o uso desta técnica não é suficiente para discriminação desta variante, técnicas sorológicas aliadas às moleculares são de grande importância na discriminação das estirpes o vírus Y. No entanto, a identificação do vírus em nível de estirpe e variantes seria de grande importância em programas de certificação de batata semente (Fonseca et al., 2005; Rigotti & Gugerli, 2007).

Recentemente, Rabelo Filho (2008), estudando diversos isolados de PVY em Minas Gerais, observou que metade deles era do tipo PVY^{NTN}. Isso demonstra a importância crescente que esse variante tem adquirido no Brasil. Para determinar a variabilidade biológica e molecular dos isolados de PVY^{NTN} que ocorrem no Brasil, neste trabalho foram coletados e estudados catorze isolados de PVY que causam anéis necróticos em tubérculos de batata, em campos produtores do Sul de Minas Gerais e de São Paulo. A discriminação destes isolados por RT-PCR, os sintomas causados em diversas hospedeiras e a sequência de nucleotídeos e de aminoácidos serão aqui apresentados e discutidos.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Isolados

Dos catorze isolados estudados, treze foram obtidos a partir de tubérculos infectados, apresentando anéis necróticos, típicos do vírus PVY^{NTN} (Figura 1). Estes foram detectados em campos de produção de batata no estado de Minas Gerais. Outro isolado apresentando o mesmo sintoma foi cedido pela Cooperbatata (SP-MO), (Quadro 1 e Figura 2). Todos foram inicialmente diagnosticados pelo teste DAS-ELISA.

QUADRO 1 Isolados de PVY^{NTN} coletados no Brasil.

Nome	Cultivar	Origem
BR-AGA	Ágata	Bom Repouso (MG)
ES-AGA	Ágata	Estiva (MG)
GO-AST	Asterix	Gonçalves (MG)
PA1-AGA	Ágata	Pouso Alegre 1 (MG)
PA2-AGA	Ágata	Pouso Alegre 2 (MG)
IP-MON	Monalisa	Ipuiúna (MG)
MF-AST	Asterix	Maria da Fé (MG)
SA-AST	Asterix	Senador Amaral (MG)
MUZ-AGA	Ágata	Muzambinho (MG)
LA-MON	Monalisa	Lavras (MG)
AN-AGA	Ágata	Andradas (MG)
SGS-MO	Monalisa	São Gonçalo do Sapucaí (MG)
SP-MO	Monalisa	Vargem Grande do Sul (SP)
IP-MAR	Markis	Ipuiúna (MG)

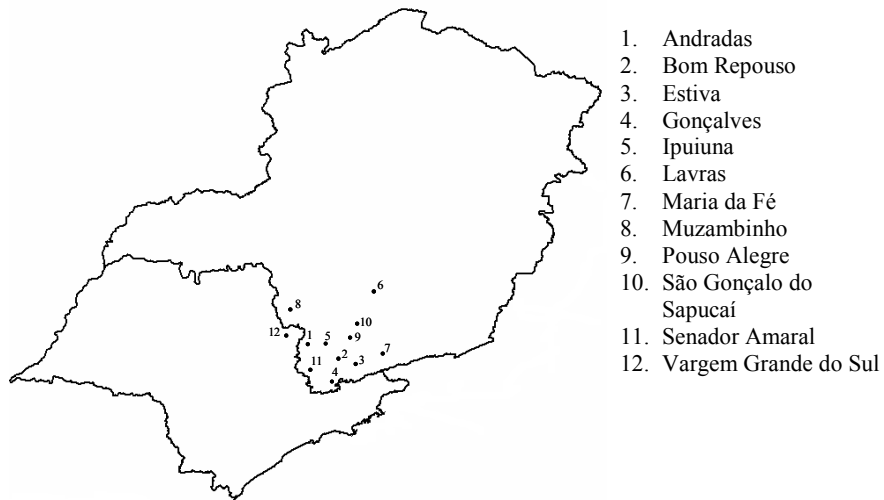


FIGURA 1 Mapa do Estado de Minas Gerais e São Paulo indicando as regiões nas quais foram coletados os catorze isolados de *Potato virus Y* (PVY^{NTN}).

2.2 Identificação e manutenção do inóculo viral

Após a coleta dos tubérculos com sintoma, estes foram submetidos a forçamento de brotação com ácido giberélico na concentração de 10 ppm. Quando houve emergência dos brotos, estes foram coletados e submetidos ao teste DAS-ELISA para diagnose do PVY, para assegurar a ausência de infecções com outros vírus. Após o teste, os tubérculos foram plantados e as folhas oriundas dos mesmos foram inoculadas mecanicamente em plantas de *Nicotiana tabacum* cv. Turkish NN que foram mantidas sob condições de casa - de - vegetação, durante a realização do experimento. Partes das folhas foram dessecadas e guardadas em sílica gel no freezer a -20°C para conservação dos isolados. Os tubérculos produzidos nos vasos foram coletados, etiquetados e armazenados em câmara fria para futuros estudos.

2.3 Inoculação dos isolados de PVY^{NTN} em plantas indicadoras

As plantas indicadoras foram obtidas em casa - de - vegetação por meio de semeadura em bandejas e o posterior transplante para vasos com capacidade de 2 Kg, contendo como substrato adequado. Foram testadas catorze hospedeiras escolhidas entre aquelas normalmente descritas na literatura (Tabela 2) com três repetições para cada espécie. Estas foram inoculadas mecanicamente, com os diferentes isolados de PVY^{NTN}, no estágio de três a quatro folhas definitivas utilizando extrato, obtido pela maceração de 1g de folha infectada em almofariz, na presença de 10 mL de solução tampão fosfato 0,01M, pH7, contendo sulfato de sódio na mesma molaridade. Este foi friccionado nas folhas previamente polvilhadas com carborundum (400 mesh), com o auxílio de uma espátula enrolada em algodão. Logo depois, as folhas foram lavadas com água corrente e as plantas foram mantidas em casa de vegetação até a avaliação final dos sintomas, ou seja, por aproximadamente 30 dias após a inoculação. Esse procedimento foi realizado em duas épocas do ano e maio a julho e de setembro a novembro de 2007.

2.4 Caracterização sorologia DAS-ELISA

A técnica DAS-ELISA (double antibody sandwich – enzyme linked immunosorbent assay), empregada para diagnose do PVY e também do PVX, PVS e PLRV, foi realizada empregando-se kits de antissoro da Bioreba de origem Suíça, seguindo o protocolo sugerido pelo fabricante. As soluções tampões empregadas foram preparadas no laboratório: cobertura (carbonato e bicarbonato de sódio 0,025M, pH 9.6, contendo 0,02 % de azida sódica), a de extração da amostra (Tris-base pH 7,4, contendo 0,8% de NaCl; 2% de PVP; 0,05% de tween-20; 0,02% de KCl e 0,02% de azida sódica), do conjugado (Tris, 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 e 0,05% de Tween – 20), do substrato

(0,97% de Dietanolamina; pH 9.8 e 0,02 % de azida sódica) e de lavagem (solução salina tamponada (PBS) contendo 0,05% de tween-20). Utilizaram-se microplacas padrão da Costar (USA) com 96 orifícios.

A leitura foi feita a 405 nm, no leitor de placas da Dynatech laboratories, modelo MRX, considerando-se positivas as amostras cujas leituras de absorbância foram maiores ou iguais a duas vezes a média da absorbância dos controles negativos, compreendido pelo suco da planta sadia (Clark & Adams, 1977).

QUADRO 2 Espécies de plantas hospedeiras inoculadas com os diferentes isolados de PVY^{NTN}.

Espécies	Família
<i>Nicotiana tabacum</i> cv. White Burley	<i>Solanaceae</i>
<i>Nicotiana tabacum</i> cv. 'TNN'	<i>Solanaceae</i>
<i>Nicotiana tabacum</i> cv. Havana	<i>Solanaceae</i>
<i>Nicotiana tabacum</i> cv. Turkish	<i>Solanaceae</i>
<i>Nicotiana rústica</i>	<i>Solanaceae</i>
<i>Nicotiana glutinosa</i>	<i>Solanaceae</i>
<i>Chenopodium amaranticolor</i>	<i>Chenopodiaceae</i>
<i>Chenopodium quinoa</i>	<i>Chenopodiaceae</i>
<i>Physalis floridana</i>	<i>Solanaceae</i>
<i>Gomphrena globosa</i>	<i>Amaranthaceae</i>
<i>Datura stramonium</i>	<i>Solanaceae</i>
<i>Capisicum annum</i> cv. Florida VR-2	<i>Solanaceae</i>
<i>Capisicum annum</i> cv. Bastidon	<i>Solanaceae</i>
<i>Capisicum annum</i> cv. Yolo Y	<i>Solanaceae</i>

2.5 Extração do RNA (total)

A extração do RNA total seguiu o protocolo do método de Trizol (AFGC Project, 2002). Folhas jovens, infectadas (0,40g), foram maceradas em almofariz na presença de nitrogênio líquido e, ao pó obtido, foram adicionados 3 mL da solução de extração (trizol: 118,16g de guanidina tiocianato, 0,8M;

76,12g de amônia tiocianato, 0,4M; acetato de sódio 33,4 mL, 0,1M; glicerol 50 mL e água ultra pura). O extrato obtido foi transferido para tubos Eppendorf de 1,5 mL, que foram colocados em banho-maria por 5 minutos a 60°C. Em seguida, foram agitados em vórtex e centrifugados a 12.000 rpm por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi transferido para um outro tubo, descartando-se o precipitado. Foram então adicionados 300µL de clorofórmio em cada micro tubo que foram agitados em vortex, deixados à temperatura ambiente (25°C) por 3 minutos e centrifugados a 12.000 rpm por 10 minutos a 4°C. A fase aquosa foi cuidadosamente transferida para outro tubo, adicionando-se ½ do seu volume de isopropanol e ½ de uma solução contendo 0,8M de Citrato de sódio e 1,2 M de NaCl. Misturou-se por inversão, e deixou-se à temperatura ambiente por 10 minutos para a precipitação do RNA. Em seguida, os tubos foram centrifugados a 12.000 rpm por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado com 300 µL de etanol 75% e secado a vácuo por 1 minuto. Finalmente, o precipitado foi ressuscitado em 25µL de água ultra pura tratada com dietilpirocarbonato (DEPC). O RNA total extraído foi analisado por eletroforese em gel de agarose a 0,7%, antes de ser empregado no teste de RT-PCR.

2.6 RT-PCR e sequenciamento do cDNA

A discriminação inicial do PVY^{NTN} foi feita por meio de RT-PCR, utilizando-se três *primers* desenhados por Boonham et al. (2002), com base nas sequências depositadas no GenBank, para a região da capa protéica e da proteína Nib de PVY^O e PVY^N. Para a amplificação da região da capa protéica a ser sequenciada, desenhou-se um par de primers com base também nas sequências depositadas no GenBank. As sequências e a localização dos primers no genoma desses vírus estão apresentadas na (Tabela 1).

TABELA 1 Primers usados na detecção e discriminação da variante de PVY^{NTN} e na amplificação da capa protéica.

Vírus	Primers	Sequência (5'- 3')	Posição dos primers
PVY ^O	O-8787-F	TCTGGRACACATACWGTRCCRA	8.687 á 8.710
PVY ^O	O-9295-R	TGTA CTGATGCCACCGTCGAAC	9.274 á 9.295
PVY ^N	N-8687-F	TCTGGA ACTCAYACTGTGCCAC	8.687 á 8.710
PVYF	Y-8549-F	GCGATACTTATGAAGTGCACC	8.549 á 8.569
PVYR	Y-9397-R	CGTCCGGAGGAGCACTAC	9.397 á 9.414

A reação para a síntese do cDNA foi preparada para um volume final de 20µL, contendo: 1 µL do primer anti-senso PVY^O 0-9295-R (10mM); 5 µL do RNA total; 1 µL de dNTPs (10 mM); 6 µL de água ultrapura tratada com DEPC. Esta mistura foi aquecida a 65°C por 5 minutos e colocada rapidamente no gelo. Foram então adicionados 4 µL do 5X First-Strand Buffer e 2 µL de DTT (0.1M), misturando-se cuidadosamente e aquecendo-se 37°C por 2 minutos. Após este aquecimento, foi acrescentado 1 µL de M-MLV RT (Invitrogen), e os tubos foram incubados a 37°C por 50 min, e a 70°C por 15 min, após o que foram transferidos para um recipiente, contendo gelo moído até a sua utilização na reação de PCR.

A reação de PCR foi montada para um volume final de 25 µL, contendo: 5 µL de buffer 5X PCR, 1,5 µL de MgCl₂ (25 mM), 0,5 µL de dNTPs 10 mM, 1,25 µL do *primer* O-9295-R, 1,25 µL do *primer* O-8687-F, 1,25 µL do primer N-8687-F, 0,25 µL da enzima Go Taq DNA polimerase, 2 µL do cDNA e 12 µL de água ultrapura tratada com DEPC. As condições para amplificação do cDNA foram: 94°C por 2 minutos, seguido de 30 ciclos: 94° por 1 min, 65°C por 1 min, e 72°C por 1 min, com uma elongação final de 72°C por 10 minutos. O produto de amplificado foi analisado por eletroforese em gel de agarose a 0,7%, corado com GelRed Nucleic Acid Gel Stain (Invitrogen) e visualizado no trans-illuminador, sob luz ultravioleta.

Os fragmentos genômicos referentes à capa protéica dos isolados estudados, foram purificados a partir do gel de agarose, empregando-se o Kit de

Purificação “GFX PCR DNA and Gel Band Purification KIT” da empresa Biosciences, e sequenciados no laboratório da EMBRAPA de Sete Lagoas.

2.7 Análise filogenética

As sequências obtidas foram comparadas com as sequências disponíveis no NCBI, utilizando o Programa Blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>). O alinhamento múltiplo das sequências dos isolados de PVY^{NTN} com os outros 16 isolados de PVY disponíveis no “GenBank” (Quadro 4), foram gerados com o Programa CLUSTALW (<http://clustalw.genome.jp>). As análises filogenéticas foram obtidas por meio do programa MEGA versão 4.0 (www.megasoftware.net), com bootstrap, considerando os valores superiores a 2.000 repetições.

QUADRO 3 Relação dos isolados de *Potato virus Y* (PVY) disponíveis no GenBank, empregados para comparação das sequências genéticas com as sequências dos isolados estudados.

Acesso	Origem	Estirpe	Autores/publicação
AF255660	Brasil	PVY ^N	Inoue-Nagata et al. (2001)
AY884982	Canadá	PVY ^{NTN}	Lorenzen et al. (2006)
AY601680	China	PVY ^{NTN}	Ding et al. (2004)
AJ390296	EUA	PVY ^{NTN}	Boonham et al. (1999)
AF325927	EUA	PVY ^{NTN}	Boonham et al. (não publicado)
X92078	França	PVY ^N	Le Romancer et al. (não publicado)
X79305	Holanda	PVY ^{NTN}	Heuvel et al. (2008)
AJ133454	Inglaterra	PVY ^{NTN}	Boonham et al. (1999)
AJ390295	Inglaterra	PVY ^{NTN}	Boonham et al. (1999)
EF027879	Inglaterra	PVY ^{NTN}	Gow et al. (2006)
EF027891	Inglaterra	PVY ^N	Gow et al. (não publicado)
EF027892	Inglaterra	PVY ^{NTN}	Gow et al. (2006)
AB3315547	Japão	PVY ^{NTN}	Ogawa et al. (2008)
Z70237	Polônia	PVY ^N	Chachulska et al. (2006)
AB295479	Síria	PVY ^{NTN}	Ali et al. (2007)
AM411503	Vietnã	PVY ^{NTN}	Nguyen et al. (2006)

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Caracterização biológica dos isolados de PVY^{NTN}

Todas as indicadoras que apresentaram sintomas, quando inoculadas com os isolados estudados foram Elisa positivos e todas as que não apresentaram sintomas foram ELISA negativas para o PVY. Os sintomas induzidos nas hospedeiras estão discriminados nas (Quadros 5 e 6). Conforme já relatado por outros autores (De Bokx & Huttinga, 1981; Le Romancer et al., 1994), as espécies de *C. quinoa*, *C. amaranticolor*, *D. stramonium* e *G. globosa* se comportaram como imunes a todos os isolados de PVY estudados. Todos eles induziram sintomas de mosaico severo, necrose das nervuras, lesão necrótica local, distorção foliar, encarquilhamento e subdesenvolvimento das plantas de fumo cvs. White Burley, Turkish e Turkish NN (Figura 2). Esses sintomas evoluíram para uma necrose completa das folhas, que permaneceram penduradas na planta cerca de 25 dias após a inoculação. Em *N. glutinosa* os sintomas foram de mosaico, evoluindo para pontos necróticos locais e subdesenvolvimento da planta. Esses sintomas, nessas espécies de *Nicotiana*, são típicos de PVY^N e do variante PVY^{NTN} (Gooding et al., 1985; Blancard & Cailleateau, 1995; Le Romancer et al., 1994; Moraes, 2003).

Por outro lado, plantas de *N. rústica* e *N. tabacum* cv. Havana apresentaram o mesmo tipo de sintoma, caracterizado apenas por mosaico leve, quando inoculadas com todos os isolados. Assim sendo, essas hospedeiras não poderiam ser consideradas para uso em uma possível diferenciação entre isolados de PVY^{NTN}.

As plantas de *P. floridana* reagiram com mosaico, embolhamento e encarquilhamento nas folhas jovens, seguidos de subdesenvolvimento. Os isolados de PVY^N estudados por Moraes (2003), induziram sintomas semelhantes. De um modo geral, como já foi observado por outros autores

(Hiruki, 1974; De Bokx & Piron, 1990), os sintomas nas diversas hospedeiras tenderam a ser mais intensos no inverno.

QUADRO 4 Sintomas apresentado pelas espécies de plantas inoculadas mecanicamente com sete isolados de PVY^{NTN}, no período de maio a julho e de setembro a novembro/2007*.

Espécies inoculadas	Isolados de PVY ^{NTN}						
	AN-AGA	BR-AGA	ES-AGA	GO-AST	IP-MAR	IP-MON	LA-MON
<i>C. annuum</i> cv. Bastidon	M	M	M	M	M	M	M
<i>C. annuum</i> cv. Floridana VR-2	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS
<i>C. annuum</i> cv. Yolo Y	M	M	M	M	M	M	M
<i>Chenopodium amaranticolor</i>	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS
<i>Chenopodium quinoa</i>	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS
<i>Datura stramonium</i>	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS
<i>Gomphrena globosa</i>	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS
<i>N. tabacum</i> cv. Turkish	M, NN, PCL, MF, S	M++, NN, PCL, MF, S+	M+, NN+, PCL, MF, S	M+, NN+, PCL, MF, S	M++, NN+, PCL, MF, S+	M++, NN+, PCL, MF, S+	M+, NN, PCL, , MF, S
<i>N. tabacum</i> cv. White Burley	M, NN, PCL, MF, S	M++, NN, PCL, MF, S+	M+, NN+, PCL, MF, S	M+, NN+, PCL, MF, S	M++, NN+, PCL, MF, S+	M++, NN+, PCL, , MF, S+	M+, NN, PCL, , MF, S
<i>Nicotiana glutinosa</i>	M, PCL, S	M, PCL, S+	M, PCL, S	M, PCL, S	M, PCL, S+	M, PCL, S+	M, PCL, S
<i>Nicotiana rustica</i>	M	M	M	M	M	M	M
<i>Nicotiana tabacum</i> cv. Havana	M	M	M	M	M	M	M
<i>Nicotiana tabacum</i> cv. TNN	M+, PCL, NN+, MF, S	M++, PCL, NN+, MF, S+	M, NN+, PCL, MF, S	M+, NN+, PCL, MF, S	M++, PCL, NN+, MF, S+	M++, NN+, PCL+, MF, S+	M+, NN+ PCL, , MF, S
<i>Physalis floridana</i>	M, EM, S	M+, EM+, S+	M, EM, S	M+, EM, S	M+, EM+, S+	M+, EM+, S+	M, EM, S

* Os sintomas foram semelhantes nos dois períodos de inoculação, sendo, porém mais intensos nos meses de maio a julho. SS=sem sintomas; M=mosaico; EM=embolhamento; S=subdesenvolvimento da planta; NN= necrose das nervuras; PCL=pontos cloróticos locais; MF=morte das folhas. Sintomas: (sem sinal) sintomas fracos, (+) sintomas intermediários, (++) sintomas severos.

QUADRO 5 Sintomas apresentado pelas espécies de plantas inoculadas mecanicamente com sete isolados de PVY^{NTN}, no período de maio a julho e de setembro a novembro/2007*.

Isolados de PVY ^{NTN}							
Espécies inoculadas	MF-AST	MU-AGA	PA-AGA1	PA-AGA2	SA-AST	SGS-MO	SP-MO
<i>C. annuum</i> cv. Bastidon	M++	M++	M	M++	M	M++	M++
<i>C. annuum</i> cv. Floridana VR-2	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS
<i>C. annuum</i> cv. Yolo Y	M++	M++	M	M	M	M++	M++
<i>Chenopodium amaranticolor</i>	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS
<i>Chenopodium quinoa</i>	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS
<i>Datura stramonium</i>	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS
<i>Gomphrena globosa</i>	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS
<i>N. tabacum</i> cv. Turkish	M++, NN++, PCL++, MF, S++	M++, NN++, PCL++, MF, S++	M++, NN+, PCL+, MF, S+	M++, NN++, PCL++, MF, S++	M++, NN+, PCL+, MF, S+	M++, NN+, PCL, MF, S+	M++, NN++, PCL, MF, S++
<i>N. tabacum</i> cv. White Burley	M++, NN++, PCL++, MF, S++	M++, NN++, PCL++, MF, S++	M++, NN+, PCL+, MF, S+	M++, NN++, PCL++, MF, S++	M++, NN+, PCL, MF, S+	M++, NN+, PCL, MF, S+	M++, NN++, PCL, MF, S++
<i>Nicotiana glutinosa</i>	M++, PCL, S++	M++, PCL, S++	M+, PCL, S+	M, PCL, S++	M, PCL, S+	M, PCL, S+	M, PCL, S++
<i>Nicotiana rustica</i>	M	M	M	M	M	M	M
<i>Nicotiana tabacum</i> cv. Havana	M	M	M	M	M	M	M
<i>Nicotiana tabacum</i> cv. TNN	M++, NN++, PCL++, MF, S++	M++, NN++, PCL, MF, S++	M++, NN+, PCL+, MF, S+	M++, NN++, PCL, MF, S++	M++, NN+, PCL, MF, S+	M++, NN+, PCL+, MF, S+	M++, NN++, PCL+, MF, S++
<i>Physalis floridana</i>	M, EM, S++	M, EM, S++	M, EM, S+	M, EM, S++	M, EM, S+	M, EM, S+	M, EM, S++

* Os sintomas foram semelhantes nos dois períodos de inoculação, sendo, porém mais intensos nos meses de maio a julho. SS=sem sintomas; M=mosaico; EM=embolamento; S=subdesenvolvimento da planta; NN= necrose das nervuras; PCL=pontos cloróticos locais; MF=morte das folhas. Sintomas: (sem sinal) sintomas fracos, (+) sintomas intermediários, (++) sintomas severos.



FIGURA 2 Sintomas induzidos por três isolados de PVY^{NTN} em quatro cultivares de fumo. A - White Burley; B - *Nicotiana glutinosa*; C - Turkish; D - Turkish NN. 1 - Sadia; 2 - AN-AGA; 3 - IP - MON; 4 - MU-AGA.

As plantas de pimentão das cultivares Bastidon e Yolo Y apresentaram sintomas que variaram de leve a severo, dependendo do isolado (Figura 3), enquanto que as da cultivar Florida VR-2 comportaram-se como imunes a todos os isolados estudados. Resultados semelhantes foram obtidos por outros autores, que observaram que isolados desse vírus foram capazes de infectar pimentão das cultivares Bastidon e Yolo Wonder, mas não *C. quinoa* e *C. amaranticolor* (Le Romancer et al., 1994; Truta et al., 2004; Costa, 2008).

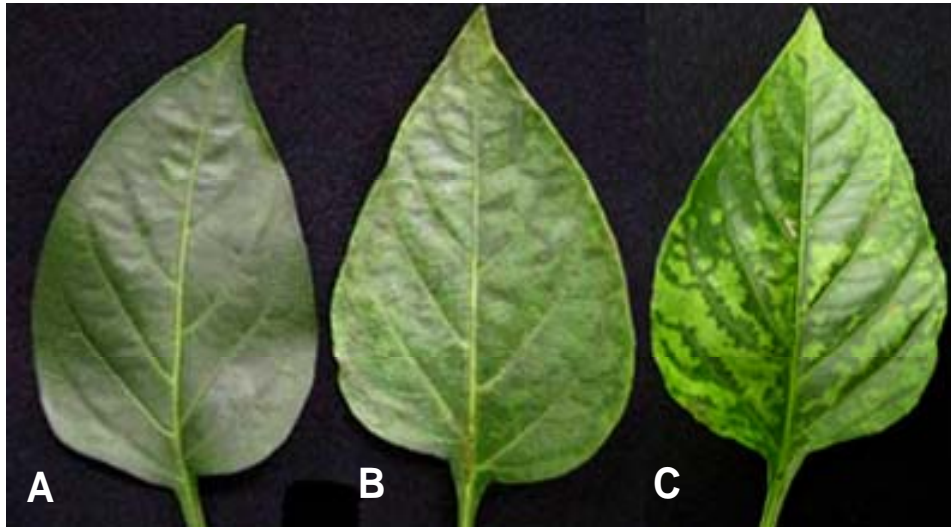


FIGURA 3 Folhas de *Capsicum annuum* cv. Yolo Y, com diferentes intensidades de sintomas de mosaico causados por isolados de PVY. A- Sadia; B: LA-MON (mosaicos leves); C: MU-AGA (mosaico severo).

Quando Truta et al. (2004) estudaram 22 isolados de PVY proveniente de plantas de pimentão e dois de plantas de batata, pertencentes às estirpes necrótica (PVY^N-BR) e comum (PVY^O-BR), eles observaram que os isolados necróticos infectaram as cultivares Bastidon, Yolo Wonder e Yolo Y, mas não foram capazes de infectar a cultivar Florida-VR. Todas as cultivares testadas não apresentaram sintomas e foi ELISA negativa quando inoculadas com PVY^O. Eles observaram também alto grau de variabilidade genética entre os isolados de pimentão e batata, sendo que dois isolados provenientes de pimentão causaram infecção latente e um induziu sintomas de mosaico em plantas de batata.

Morais (2003) observou que isolados de PVY de oriundos de plantas de batata foram capazes de infectar pimentão cv. Agrônômico 10G, causando sintomas de mosaico leve, quase imperceptível. Entretanto, Gebre et al. (1985) estudaram diversos isolados de PVY provenientes do pimentão e descreveram que nenhum deles foi capaz de infectar plantas de batata, o que demonstra a

grande diversidade patogênica entre isolados de PVY provenientes de diferentes regiões.

Dos isolados estudados, os mais severos foram MF-AST, MUZ-AGA, PA-AGA2, e SP-MON, enquanto que os menos severos foram o AN-AGA, ES-AGA, LA-MON e GO-AST, e os demais induziram sintomas intermediários. Esses dados indicam a alta variabilidade genética que existe nesta variante, além de ser transmitida facilmente por inseto vetor, o que agravaria ainda mais o problema no campo. Isso demonstra a importância de se controlar o índice de vírus nas sementes, com a finalidade de diminuir a sua presença no campo.

3.2 Caracterização molecular dos isolados de PVY^{NTN}

A melhor combinação de primers que permitiu separar com clareza os isolados PVY^N dos isolados PVY^{NTN}, foi a que empregou o primer anti-senso desenhado para a estirpe PVY^O (O-9295-R) para fazer o cDNA, na RT-PCR, e esse e mais dois primers, sendo um para PVY^N (N-8687-F) e um para o PVY^O (O-8787-F) na reação de PCR. Esses primers foram escolhidos entre os diversos sugeridos por Boonham et al. (2002a), para a separação de estirpes do PVY. Eles permitiram a amplificação de uma banda 280 pb, para isolados de PVY^N, e uma com 609 pb para isolados de PVY^{NTN}, resultando numa eficiente discriminação entre eles (Figura 4). O par de primers desenhados com base nas sequências do gene da capa protéica gerou um fragmento de 866 pb (Figura 5), conforme o esperado.

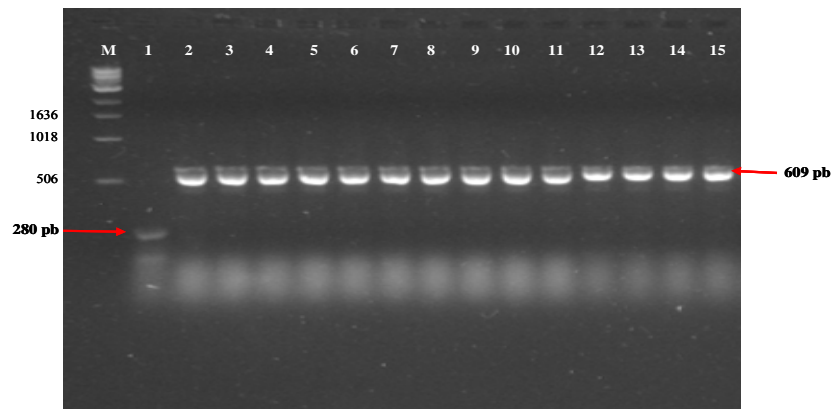


FIGURA 4 Análise eletroforética em gel de agarose dos produtos da PCR. M = 1Kb ladder; 1 - PVY^N; de 2 a 15 isolados de PVY^{NTN}, bandas obtidas com os primers desenhados por Boonham et al. (2002b), sendo: 2 - AN-AGA; 3 - BR-AGA; 4 - ES-AGA; 5 - GO-AST; 6 - IP - MAR; 7 - IP-MON; 8 - LA-MON; 9 - MF-AST; 10 - MU-AGA; 11 - PA-AGA1; 12 - PA-AGA2; 13 - SA-AST; 14 - SGS-MO e 15 - SP- MO.

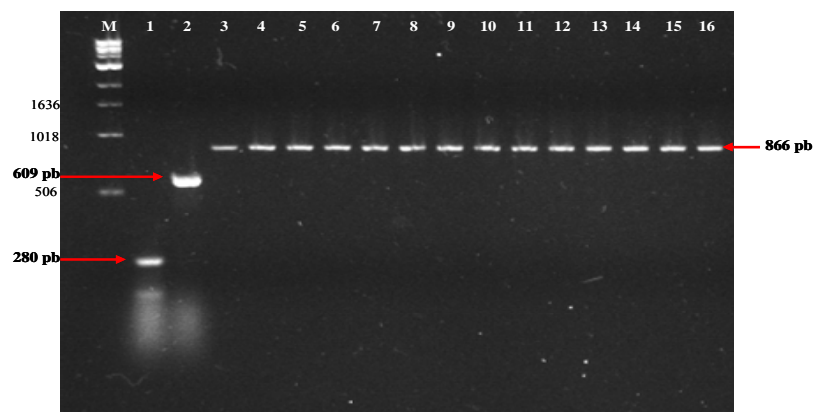


FIGURA 5 Análise eletroforética em gel de agarose dos produtos da PCR. M = 1Kb ladder; 1 - PVY^N; 2 - PVY^{NTN}, bandas obtidas com os primers desenhados por Boonham et al. (2002b), as bandas de 3 a 16 com os primers desenhados para *Potato virus Y*, abordando o gene da capa protéica sendo: 3 - AN-AGA; 4 - BR-AGA; 5 - ES-AGA; 6 - GO-AST; 7 - IP - MAR; 8 - IP-MON; 9 - LA-MON; 10 - MF-AST; 11 - MU-AGA; 12 - PA-AGA1; 13 - PA-AGA2; 14 - SA-AST; 15 - SGS-MO e 16 - SP- MO.

De acordo com a literatura, várias combinações de primers foram publicadas para diferenciação das estirpes e variantes de PVY, porém a maioria desses apresentou a desvantagem em diferenciar isolado de PVY^{NTN} de PVY^N e PVY^O, amplificando mais de uma banda, a mesma banda ou apresentando ausência de banda para um destes vírus (Weilguny & Singh, 1998; Boonham et al., 2002a; Boonham et al., 2002b; Fonseca et al., 2005; Moravec et al., 2003; Nie & Singh, 2002; Chikh Ali et al., 2007; Rigotti & Gurgerli, 2007; Schubert et al., 2007).

Comparando-se as sequências dos isolados estudados entre si, por meio do alinhamento múltiplo dos nucleotídeos, observou-se que a menor identidade foi de 93%, entre os isolados MU-AGA (de Muzambinho) e SGS-MO (de São Gonçalo do Sapucaí) e a maior identidade foi de 100%, entre os isolados GO-AST, (de Gonçalves) e o SA-AST, (de Senador Amaral) (Tabela 2 e Figura 1A). Pode-se observar ainda que o isolado SGS-MO foi o que apresentou maior variabilidade em relação aos demais, com a maioria das identidades entre 94 e 95%. O mesmo aconteceu quando esse foi comparado com os isolados do GenBank, ficando as menores identidades entre 92%, com os isolados estudados por Boonham et al. (1999), AJ390296 dos Estados Unidos e AJ390295 da Inglaterra e um isolado da estirpe necrótica EF027891 e 95% com a maioria. Na comparação dos demais isolados estudados e os do GenBank, as identidades variaram entre 93 e 99%.

De um modo geral, quando se tenta analisar a diversidade genômica da região da capa protéica com os sintomas induzidos nas diferentes hospedeiras, não é possível encontrar uma correlação entre a diversidade e severidade de sintomas induzidos. Isso indica que a diversidade encontrada na região da capa protéica não deve ser a responsável pela expressão dos sintomas nas plantas hospedeiras. Outro fato que se pode notar, é que as sequências depositadas no

TABELA 2 Porcentagem de identidade na sequência de nucleotídeos do gene da capa protéica entre os catorze isolados estudados em comparação com a sequência de outros dezesseis isolados de PVY depositados no GenBank.

Nº	Isolados	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	
1	MF-AST	99	98	99	99	99	98	98	96	99	99	94	99	99	99	99	98	99	98	98	98	98	98	96	96	96	98	96	98	97	
2	AN-AGA	-	98	99	99	99	98	98	97	99	99	95	99	99	99	99	98	99	98	98	98	98	98	96	96	96	98	96	98	97	
3	BR-AGA		-	98	98	98	98	98	96	98	98	95	98	98	99	99	98	99	98	99	98	98	99	96	96	96	98	96	98	97	
4	ES-AGA			-	99	99	98	98	97	99	99	94	99	99	99	99	98	99	98	98	98	98	98	96	96	96	98	96	98	97	
5	GO-AST				-	99	98	98	96	99	99	94	99	100	99	99	98	99	98	98	98	98	98	96	96	96	98	96	98	97	
6	IP-MON					-	98	98	97	99	99	94	99	99	99	98	98	98	98	98	98	97	98	96	96	96	97	96	98	97	
7	IP-MAR						-	98	96	98	98	94	98	98	99	99	99	99	98	99	98	99	99	96	96	96	98	96	99	97	
8	LA-MON							-	96	98	98	94	98	98	99	98	98	98	98	98	97	98	98	96	95	96	97	95	98	96	
9	MU-AGA								-	97	97	93	96	96	97	97	97	97	97	97	97	96	97	97	98	94	94	96	94	97	95
10	PA-AGA1									-	99	94	99	99	99	99	98	99	98	98	98	98	98	96	96	96	98	96	98	97	
11	PA-AGA2										-	94	99	99	99	98	98	98	98	98	97	98	98	96	96	96	97	96	98	97	
12	SGS-MO											-	94	94	95	95	95	95	95	95	95	94	95	95	92	92	93	94	92	95	93
13	SP-MO												-	99	98	98	98	98	98	98	97	98	98	96	96	96	97	96	98	97	
14	SA-AST													-	99	99	98	99	98	98	98	98	98	96	96	96	98	96	98	97	
15	EF027892														-	99	99	99	99	99	98	99	99	97	96	97	98	96	99	97	
16	AB295479															-	99	99	99	99	98	99	99	97	97	97	98	97	99	97	
17	AY884982																-	99	99	99	98	99	99	97	96	96	98	96	99	97	
18	AY601680																	-	99	99	98	99	99	97	96	97	98	96	99	97	
19	AF325927																		-	99	98	99	99	97	96	96	98	96	99	97	
20	EF027879																			-	98	99	99	97	96	97	98	96	99	97	
21	Z70237*																				-	98	98	96	95	96	100	95	98	96	
22	X79305																					-	99	97	96	96	98	96	99	97	
23	AJ133454																						-	97	97	97	98	97	99	97	
24	AJ390296																							-	94	94	96	94	97	95	
25	EF027891*																							-	99	95	99	96	98		
26	AB331547																								-	96	99	96	98		
27	X92078*																									-	95	98	96		
28	AJ390295																										-	96	98		
29	AM411503																											-	97		
30	AF255660*																												-		

* Isolados da estirpe necrótica (PVY^N)

GenBank dos isolados da estirpe necrótica Z70237 da Polônia e o isolado X92078 da França, apresentou identidade entre 94 e 98% para todos os isolados de PVY^{NTN} aqui estudados. Isso poderia ser explicado pelo fato dos isolados NTN apresentarem ausência de anéis necróticos nos tubérculos, podendo levar a uma confusão no momento da identificação (Boonham et al., 2002b). Le Romancer & Nedellec (1997) estudaram a suscetibilidade de 33 cultivares de batata a isolados do tipo NTN, e concluíram que esses nem sempre induzem anéis necróticos nos tubérculos de batata, e que, muitas vezes, eles aparecem apenas após um período de armazenamento de, pelo menos, três meses em câmara fria. A reação da planta dependeu do seu genótipo, do isolado viral e das condições ambientais.

Glais et al. (2002), comparando a variabilidade genômica de isolados necróticos de PVY, encontraram resultados que sugeriram alta probabilidade das regiões P1 e HC-Pro estarem envolvidas na indução de necrose em folhas de fumo causadas por PVY^N, PVY^{NTN} e PVY^{NW}, enquanto que apenas a proteína HC-Pro estaria envolvida com o fenótipo de necrose em tubérculos de batata, considerando a comparação do genoma dos quatro grupos de isolado citados por esses autores (PVY^O, PVY^N, PVY^{NTN} e PVY^{NW}). Para os isolados de PVY^N e PVY^{NTN} parece que as regiões NIa, NIIb e CP (2/3 N-terminal), juntas ou separadas estariam relacionados com esta função. Tribodet et al. (2005) trabalhando com mutantes de PVY observaram que a parte C-terminal da HC-Pro, incluindo os resíduos K(400) e (419), estavam envolvidos na indução de necrose nas nervuras das plantas de fumo, principal característica da estirpe necrótica. Esses autores ainda afirmam, neste trabalho, que os motifs de aminoácidos K/E (AAA/GAA), estão presentes em isolados necróticos e é ele o responsável por este sintoma em folhas de fumo. Resultados contrários foram obtidos por Schubert et al. (2007) em estudos de análise de polimorfismo de um único nucleotídeo, onde os isolados necróticos SAG1 e NA-PVY^{NTN} não

apresentavam essas sequências no genoma e também não induziram necrose em fumo, sugerindo que estes pertenciam à estirpe comum (PVY^O).

No alinhamento dos aminoácidos (Tabela 3 e Figura 2A), a identidade mínima foi de 90% entre os isolados de Muzambinho (MU-AGA) e Lavras (LA-MON) e São Gonçalo do Sapucaí (SGS-MO) e ainda entre este último e o isolado de São Paulo (SP-MO). A máxima identidade foi de 100% entre os isolados de Gonçalves (GO-AST) e o de Senador Amaral (SA-AST), sugerindo que estes tenham, provavelmente, a mesma origem. Entre estes isolados e os do GenBank, a menor identidade foi de 90%, entre o SGS-MO e o AJ390296, dos Estados Unidos, enquanto que a máxima foi de 99%, entre o isolado IP-MAR e os isolados de PVY^{NTN} AB295479 e EF027879 entre, o da Síria e da Inglaterra, e um isolado da estirpe necrótica EF027891 também da Inglaterra. As identidades entre os isolados do GenBank com eles mesmos variaram entre 97 e 100%.

Quando ambas as árvores filogenéticas, construídas com base na sequência de nucleotídeos (Figura 6), foram analisadas os isolados se distribuíram em dois grandes grupos. O primeiro grande grupo subdividiu-se em dois subgrupos, sendo um deles composto pela maioria dos isolados e o outro formado apenas pelo MU-AGA. Já o segundo grande grupo constituiu-se pelo isolado SGS-MO, separado de todos os demais.

TABELA 3 Porcentagem de identidade na sequência de aminoácidos do gene da capa protéica entre os catorze isolados estudados em comparação com a sequência de outros dezesseis isolados de PVY depositados no GenBank.

Nº	Isolados	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
1	MF-AST	98	95	98	99	98	97	97	95	98	98	91	98	99	97	97	97	97	97	97	96	97	97	95	97	97	96	97	97	97
2	AN-AGA	-	95	99	98	99	97	96	96	98	98	91	97	98	97	97	97	97	97	97	96	97	97	95	97	97	96	97	97	97
3	BR-AGA		-	95	95	95	97	95	95	95	95	91	95	95	97	98	97	97	97	97	98	97	97	95	98	98	97	97	98	98
4	ES-AGA			-	98	99	97	96	96	99	99	91	98	98	97	97	97	97	97	97	96	97	97	95	97	97	96	97	97	97
5	GO-AST				-	98	97	97	95	98	98	91	98	100	97	97	97	97	97	97	96	97	97	95	97	97	96	97	97	97
6	IP-MON					-	96	97	96	99	99	91	98	98	97	97	97	97	97	97	96	97	96	95	97	96	96	96	96	96
7	IP-MAR						-	97	96	97	96	92	97	97	98	99	98	98	98	98	99	98	98	98	96	99	98	97	98	98
8	LA-MON							-	96	97	97	90	97	97	97	97	97	97	97	97	96	97	97	95	97	97	96	97	97	96
9	MU-AGA								-	96	97	90	95	95	97	97	97	97	97	97	97	97	96	97	97	96	97	96	96	96
10	PA-AGA1									-	99	91	98	98	97	97	97	97	97	97	96	97	97	95	97	97	96	97	97	97
11	PA-AGA2										-	91	98	98	97	97	97	97	97	97	96	95	97	96	95	97	96	96	96	96
12	SGS-MO											-	90	91	92	92	92	92	92	92	92	92	92	90	92	92	91	92	92	92
13	SP-MO												-	98	97	96	96	96	96	96	95	97	96	94	96	96	95	96	96	96
14	SA-AST													-	97	97	97	97	97	97	96	97	97	95	97	97	96	97	97	97
15	EF027892														-	99	99	100	99	99	98	100	99	97	99	99	98	99	99	98
16	AB295479															-	99	99	99	100	99	99	99	97	100	99	98	99	99	99
17	AY884982																-	99	99	99	98	99	98	98	98	99	98	98	98	98
18	AY601680																	-	99	99	98	100	99	97	99	99	98	99	99	98
19	AF325927																		-	99	99	99	98	97	99	98	99	98	98	98
20	EF027879																			-	99	99	99	97	100	99	98	99	99	99
21	Z70237*																				-	98	98	97	99	98	98	98	98	98
22	X79305																						-	99	97	99	99	98	99	99
23	AJ133454																							-	97	99	99	98	99	99
24	AJ390296																								-	97	97	97	97	97
25	EF027891*																								-	99	98	99	99	99
26	AB331547																									-	98	99	99	98
27	X92078*																										-	98	98	98
28	AJ390295																											-	99	98
29	AM411503																												-	98
30	AF255660*																													-

* Isolados da estirpe necrótica (PVY^N)

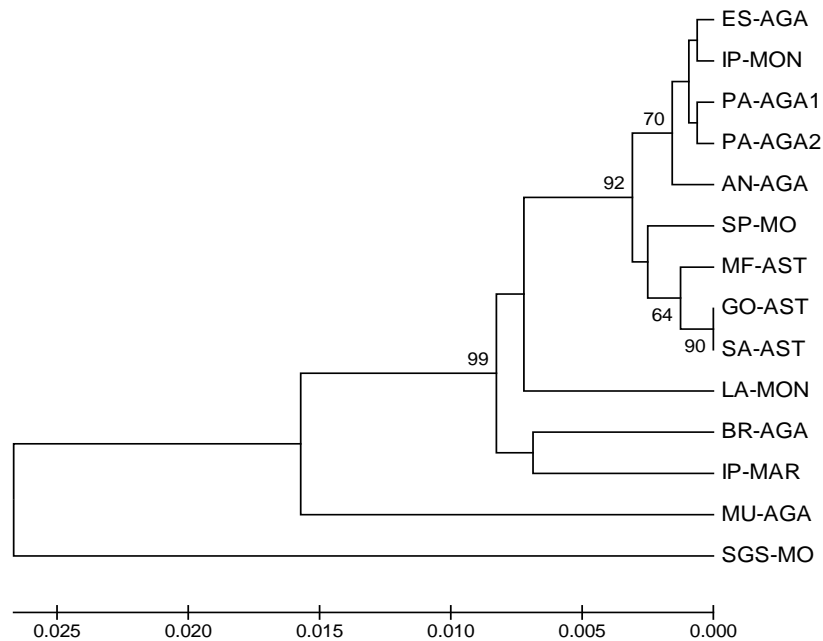


FIGURA 6 Árvore filogenética obtida com base na sequência de nucleotídeos dos isolados brasileiros de PVY^{NTN}. Os valores do bootstrap foram obtidos pelo programa MEGA, UPGMA, com 2.000 repetições.

Na árvore baseada na sequência de aminoácidos (Figura 7), os isolados LA-MON, BRA-AGA, IP-MAR e MU-AGA ficaram mais distantes dos demais e o SGS-MO, que apresentou as menores identidades com todos os demais, aparece novamente separado deles. Entretanto, os isolados que causaram sintomas mais severos em plantas de fumo se agruparam com os que causaram sintomas fracos, indicando que, provavelmente, a sequência genômica da capa protéica não está relacionada com a severidade dos sintomas induzidos nas plantas hospedeiras.

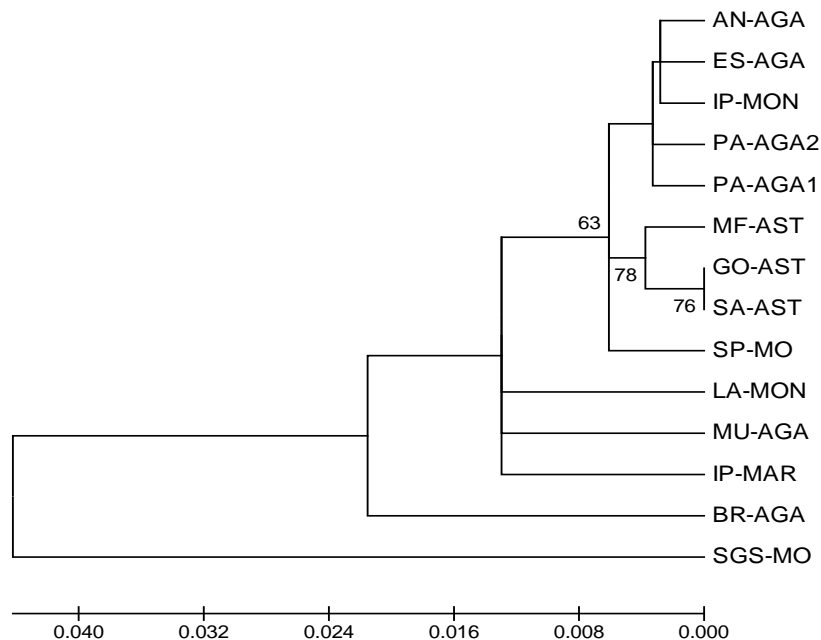


FIGURA 7 Árvore filogenética obtida com base nas sequências de aminoácidos dos isolados brasileiros de PVY^{NTN}. Os valores de bootstrap foram obtidos pelo programa Neighbor Joining, com 2.000 repetições.

Em ambas as árvores filogenéticas construídas com base na sequência de nucleotídeos e aminoácidos com todos os isolados de PVY^{NTN} aqui estudados, incluindo os do GenBank (Figura 8 e 9), foi interessante notar que o isolado SGS-MO que apresentou as menores identidades com todos os demais, ficou separado formando um subgrupo isolado. Observou-se que o isolado MU-AGA em ambas as árvores agrupou-se com o isolado AJ390296, dos Estados Unidos, indicando uma provável origem geográfica em comum. Com exceção do IP-MAR; BR-AGA e LA-MON, que se agruparam com isolados do GenBank, os demais isolados aqui estudados (AN-AGA, ES-AGA, IP-MON, PA-AGA2, PA-AGA1, MF-AST, GO-AST, SA-AGA, SP-MO) reuniram-se em um grupo distinto (Figura 8).

Na comparação de aminoácidos dos catorze isolados com os do GenBank, a maioria deles apresentaram-se maior proximidades (Figura 9), exceto o isolado IP-MAR que ficou próximo dos isolados da Europa e da Síria. O mesmo foi observado para o isolado BR-AGA que se agrupou com isolado de PVY^{NTN} japonês e dois da estirpe necrótica: Z70237 da Polônia e AF255660 do Brasil. Isso pode ter acontecido pelo fato desses isolados necróticos não terem sido propriamente classificados. O isolado LA-MON ficou próximo com os isolados brasileiros, porém permanecendo em um braço distinto.

Nie & Singh (2003a) observaram que os isolados que apresentavam necrose em tubérculos de batata da América do Norte, eram diferentes dos descritos da Europa. A diferença estava relacionada à origem dos isolados, tendo alguns surgido por mutação ao invés de recombinação entre as estirpes PVY^o e PVY^N. Resultado semelhante a esse também foi encontrado por Ogawa et al. (2008) que constataram que os isolados de PVY^{NTN} do Japão eram diferentes dos isolados dos Estados Unidos e da Europa, concluindo que os isolados japoneses se originaram de uma população local.

Chikh Ali et al. (2007) analisaram novos isolados recombinantes de PVY da coleção da Síria e observaram que a maioria destes apresentavam dois pontos de recombinação, ambos na HC-Pro/P3 e 6K2/N1a, revelando uma nova forma de recombinação genômica que ainda não havia sido descrita para PVY^{NW} (PVY^{N:O}). Esses autores verificaram por meio de estudos biológicos em fumo, sorológicos e moleculares que estes isolados apresentavam características tanto de PVY^{NW} quanto do recombinante de PVY^{NTN}, tornando difícil incluí-los nessas variantes. Então foi proposto que os novos isolados da estirpe necrótica fossem denominados de PVY^{SYR}, por ter a Síria como país de origem.

Moravec et al. (2003), analisaram diferentes isolados de PVY com o uso de três primers na RT-PCR, obtidos com base na sequência do gene da capa protéica: primer forward (Mor 1, 5'- AGGAGGAAGCACTAAGAAG - 3'),

correspondente aos nucleotídeos 8.594 – 8.611; primer reverse (Mor 2, 5'-CAAACCATAAGCCCATTCATC - 3'), correspondente às sequências de nucleotídeos 8.905 – 8.925 e um terceiro primer obtido com base nas sequências do gene da proteína NIb (Mor 3, 5' – GCACCAAATCAGGAGATTCTACT – 3'), correspondente aos nucleotídeos 8.359 – 8.383. Observaram que todos os isolados de PVY testados amplificaram uma banda de 569 pb correspondente aos primers Mor2 e Mor3, enquanto que os isolados de PVY^{NTN} amplificaram uma banda adicional com 334 pb, referente aos primers Mor1 e Mor2 do gene da capa protéica. O isolado do Canadá Tu660 apresentou uma única banda com 569 pb, porém, esse isolado é caracterizado como PVY^N, mas produz necrose em tubérculos em cultivares de batata altamente suscetível em condições de estufa. Com os estudos da sequência do primer Mor1, observaram que a maioria dos isolados de PVY^{NTN} encontrados na Europa, apresentam 98 - 100% de similaridade com outros isolados de PVY e esses apresentam uma recombinação na capa protéica de uma A por G na posição 8.611 em relação aos isolados de PVY^{NTN}. Com relação aos isolados dessa mesma variante, associados com o sintoma de necrose em tubérculos, estes ficaram mais distantes com 95 - 97% de similaridade. Esses autores concluíram que todos os isolados de PVY^{NTN} recombinantes possuem um nucleotídeo G na posição 8.611 e apóiam a hipótese que os isolados associados ao fenótipo PTNRD, não podem ser separados em uma única estirpe, por apresentar provavelmente eventos de recombinação no gene da capa protéica, os quais não foram detectados. Rigotti & Gugerli (2007) encontraram resultados semelhantes na mistura de três primers com a RT-PCR e concluíram que essa técnica consiste de uma ferramenta poderosa para detecção e diferenciação de isolados de PVY. Porém, as propriedades genéticas relacionadas com a indução de necrose em tubérculos de batata precisa ainda de mais informações pelo fato de o isolado da Suíça PVY^N-605 estar causando níveis variados de necrose em tubérculos em diferentes laboratórios europeus.

No Brasil, a constante necessidade da importação de batata semente além de elevar o custo da produção favorece a entrada de novos patógenos, os quais encontram aqui condições climáticas favoráveis a sua disseminação, podendo influenciar nas características do fenótipo e genótipo desses vírus.

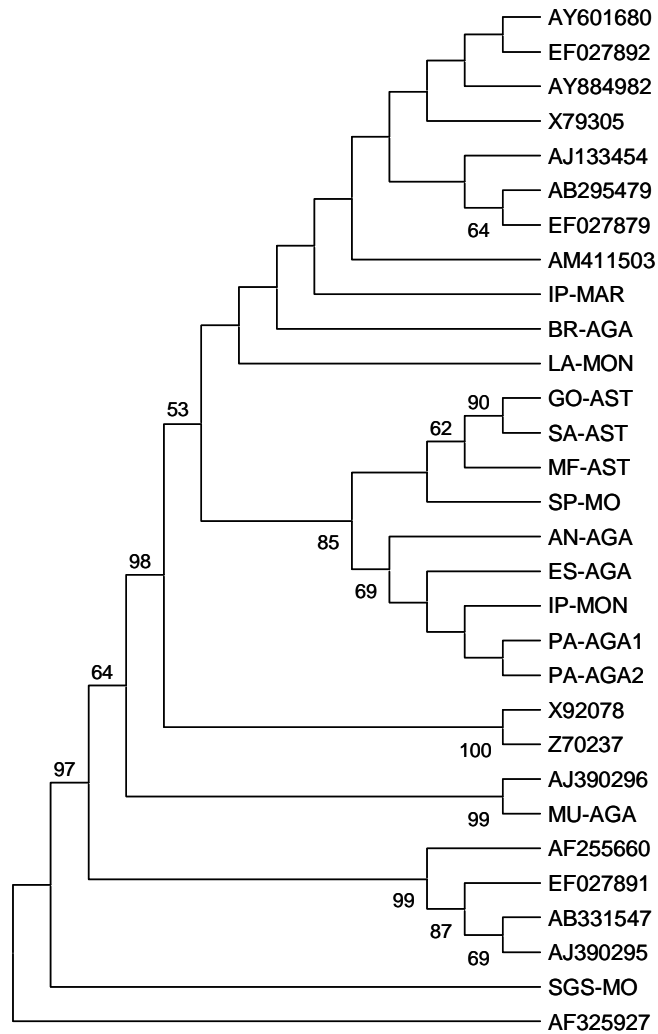


FIGURA 8 Árvore filogenética obtida com base nas sequências de nucleotídeos dos isolados brasileiros de PVY^{NTN} comparados com os isolados disponíveis no GenBank. Os valores de bootstrap foram obtidos pelo programa MEGA, UPGMA, com 2.000 repetições.

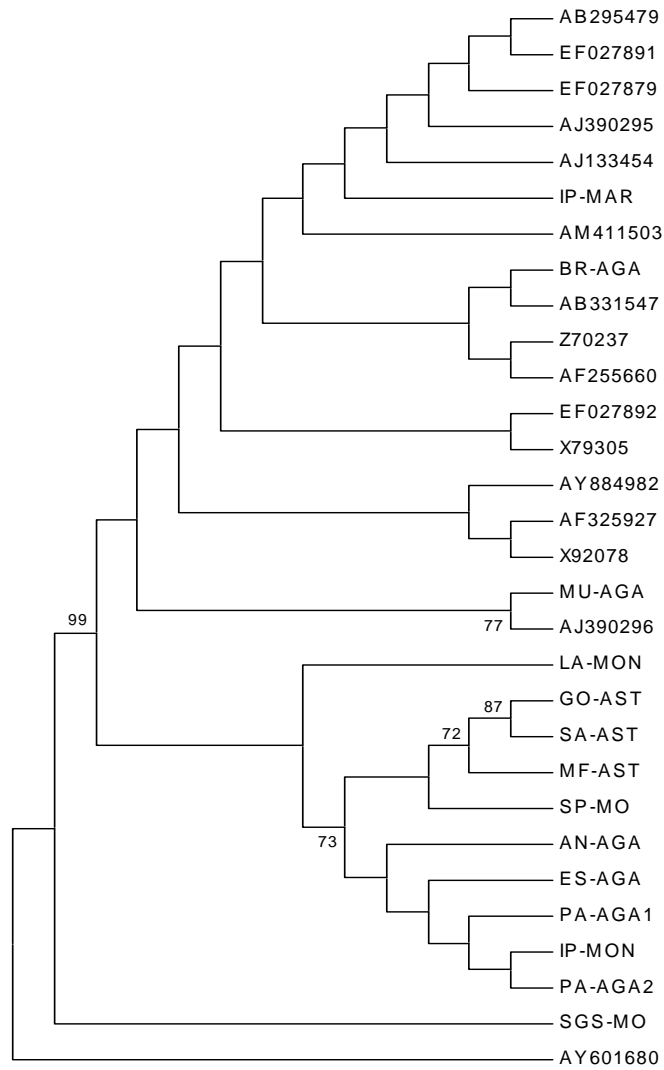


FIGURA 9 Árvore filogenética obtida com base nas sequências de aminoácidos dos isolados brasileiros de PVY^{NTN} comparados com os isolados disponíveis no GenBank. Os valores de bootstrap foram obtidos pelo programa Neighbor Joining, com 2.000 repetições.

4 CONCLUSÕES

1 Todos os isolados estudados, pertenciam a variante NTN, amplificando um fragmento de 609 pb.

2 As plantas *Chenopodium quinoa*, *C. amaranticolor*, *D. stramonium* e *G. globosa* e *Capisicum annum* cv. Florida VR-2, foram imunes aos catorze isolados de PVY^{NTN} e ELISA negativo.

3 As plantas de fumo cvs. White Burley, Turkish e Turkish NN foram as melhores indicadoras, reagindo com sintomas severos para os isolados MF-AST, MU-AGA, PA-AGA2 e SP-MON e menos severos para AN-AGA, ES-AGA, LA-MON e GO-AST e os de mais com sintomas intermediários.

4 O isolado SGS-MO foi o que apresentou as menores identidades de nucleotídeos e aminoácidos, quando comparado com todos os demais isolados. Nas árvores filogenéticas ficou separado, formando um subgrupo com o isolado AJ390296 dos Estados Unidos.

5 Nove dos isolados de PVY^{NTN} aqui estudados apresentaram alta identidade entre si, formando um subgrupo distinto nas árvores filogenéticas e indicando que a maioria deles possui uma baixa variabilidade na sequência da capa protéica.

6 Os isolados que induziram sintomas severos nas hospedeiras agruparam com isolados que induziram sintomas menos severos ou intermediários, indicando que a sequência genômica da capa protéica não está relacionada com a severidade dos sintomas.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Todos os isolados de PVY^{NTN} aqui estudados induziram o sintoma de anéis necróticos em túberculos de batata. Entretanto, muitos deles apresentaram uma alta identidade com isolados descritos como apenas necróticos. Provavelmente, isso ocorreu devido ao fato de que a indução de anéis necróticos nos tubérculos, pelos isolados PVY^{NTN}, nem sempre ocorre, pois depende de uma série de variáveis. Por outro lado, a diferença entre PVY^N e PVY^{NTN} não se encontra apenas na região da capa protéica. Nesse trabalho, foi observado que não existe correlação entre os sintomas induzidos pelos isolados e a sequência da capa protéica.

Para continuar as investigações aqui iniciadas, existe a necessidade de se fazer o sequenciamento completo dos isolados que induzem sintomas de diferentes severidades, para determinar em qual fragmento do genoma viral estariam localizadas as principais divergências.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AFGC PROJECT. **Protocols**. 2002. Disponível em: < <http://www.arabidopsis.org/portals/masc/AFGC/RevisedAFGC/site2RnaL.htm#isolation>>. Acesso em: 13 dez. 2008.
- AGRIANUAL. **Anuário da Agricultura Brasileira**. São Paulo: FNP, 2009.
- ANDRADE, E.R.; FIGUEIRA, A.R. Degenerescência em seis cultivares de batata. **Ciência e Prática**, Lavras, v.15, n.1, p.9-15, jan./mar. 1991.
- ÁVILA, A.C.; MELO, P.E.; LEITE, L.R. O vírus da batata (*Potato virus Y*) e a batata semente nacional. **Batata Show**, Itapetininga, v.7, n.17, p.14-17, abr. 2007.
- BECZNER, L.; HORVATH, J.; ROMHANYI, I.; FORSTER, H. Studies on the etiology of tuber necrotic ringspot disease in potato. **Potato Research**, Wageningen, v.27, n.2, p.339-352, Apr. 1984.
- BLANCARD, A.G.; CAILLETEAU, B. Study of the virulence of PVY isolates on tobacco: proposal for a classification integrating the resistance to necrosis. **Annales du Tabac Section 2**, Bergerac, v.27, n.9, p.43-50, Sept.1995.
- BOONHAM, N., WALSH, K., HIMS, M., NORTH, J. AND BARKER, I. Sequence comparisons within the PVY coat protein highlight a distinct group of recombinant isolates (PVY^{NTN}) associated with potato tuber necrotic ringspot disease (PTNRD). **Journal Unpublished**, United Kunited, v.22, v.6, p.112-138, Apri., 1999.
- BOONHAM, N.; PRESTON, K.W.S; NORTH, J.; SMITH, P.; BARKER, I. The detection of tuber necrotic isolate of *Potato virus Y*, and the accurate discrimination of PVY^O, PVY^N and PVY^C strains using RT-PCR. **Journal of Virological Methods**, Amsterdam, v.102, n.9, p.103-112, Sept. 2002a.
- BOONHAM, N.; WALSH, K.; PRESTON, K.W.S.; NORTH, J.; BARKER, I. Biological and sequence comparisons of *Potato virus Y* isolates associated with potato tuber necrotic ringspot disease. **Plant Pathology**, Oxford, v.51, n1, p.117-126, Mar. 2002b.
- BUTUROVIC, D.; KUS, M. The accurance of potato tuber ring disease in Yugoslavia. **Potato Research**, Wageningen, v.33, n.1, p.138, Mar. 1990.

CHIKHALI, M.; MAOKA, T.; NATSUAKI, K.T. The occurrence and characterization of. New recombinant isolates of PVY Desplauing Shared Properties of PVY^{NW} and PVY^{NTN}. **Journal of Phytopathology**, GreatBritain, v.155, n.7-8, p.409-415, Aug. 2007.

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

CLARK, M.F.E.; ADAMS, A.N. Characterization of the microplate method of enzyme linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. **Journal of General Virology**, London, v.34, n.3, p.475-483, Sept. 1977.

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

COSTA, C.L. Vetores de vírus de planta-inseto. Revisão Anual de Patologia de Plantas. In: LUZ, Q.C. (Ed.). **Revisão anual de patologia de plantas**. Passo Fundo: Universidade de Passo Fundo, 1998. Cap.6, p.103-171

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

DE BOKX, J.A.; PIRON, P.G.M. Relative efficiency for a number of aphid species in the transmission of potato virus YN in the Netherlands. **Netherlands journal of plant pathology**, Wageningen, v.96, n.2, p.237-246, apr.1990.

DE BOKX, J.A.; HUTTINGA, H. Potato virus Y. **Descriptions of plant Viruses**, Warwick, v.15, n.242, p.1-6, May 1981.

DEDIC, P.; PTÁCEK, J. The possibility of specific PVY-NTN detection. In: PROCEEDINGS 10.; TH EAPR VIROLOGY SECTION MEETING, 25., 1999, Baden. **Proceeding...** Baden: Potato Research Institute, 1999. p. 65-68.

DOUGHERTY, W.G.; CARRINGTON, J.C. Expression and function of potyviral gene products. **Annual review of phytopathology**, Palo Alto, v.26, n.1, p.123-143, Jan. 1988.

DOWLING, T.E.; MORITZ, C.; PALMER, J.D.; RIESEBERG, L.H. Nucleic Acids III: analysis of fragments and restriction sites. In: HILS, D.M.; MORITZ, C.; MABLE, B.K. (Ed.). **Molecular systematics**. 2. ed. Massachusetts: Sinauer Associates, 1996. Cap.8, p.249-320.

FAO Data base Results. **Agriculture crops primary**. 2007. Disponível em: <<http://apps.fao.org>>. Acesso em: 12 jan. 2009.

FONSECA, L.N.; INOUE-NAGATA, A.K.; NAGATA, T.; SINGH, R.P.; AVILA, A.C. Diferenciação de estirpes de *Potato virus Y* (PVY) por RT-PCR. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.23, n.4, p.904-910, out./dez. 2005.

GEBRE, S.K.; MARCHOUX, G.; DELECOLLE, B.; POCHARD, E. Variabilité naturelle des souches du virus Y de la pomme de terre dans les cultures de piment du sud-est de la France caractérisation et classification en pathotypes. **Agronomie**, Paris, v.5, n.7, p.621-630, Aug. 1985.

GLAIS, L.; TRIBODET, M.; KERLAN, C. Genomic variability in potato *Potyvirus Y* (PVY): evidence that PVY^{NW} and PVY^{NTN} variants are single to multiple recombinants between PVY^O and PVY^N isolates. **Archives of Virology**, New York, v.147, n.1, p.363-378, Mar. 2002.

GOODING JÚNIOR, G.V.; WERNSMAN, E.A.; RUFTY, R.C. Reaction of *Nicotiana Tabacum* cv. Havana 307 to strains of potato virus Y, tobacco vein mottling and tobacco etch viruses and to *Peronospora Tabacina*. **Tobacco Science**, New York, v.29, n.99, p.306-309, Apr. 1985.

GUGERLI, P.; FRIES, P. Characterization of monoclonal antibodies to Potato Virus Y and their use for virus detection. **Journal of General Virology**, London, v.64, n.11, p.2471-2477, Nov. 1983.

HIRUKI, C. Factors affecting bioassay of *Potato virus S* in *Chenopodium quinoa*. **Phytopathology**, Saint Paul, v.65, n.8, p.1288-1292, Aug. 1974.

LE ROMANCER, M.; KERLAN, C. La maladie des nécroses annulaires superficielles des tubercules: une affection de la pomme de terre, due au virus Y. **Agronomie**, Paris, v.11, n.10, p.889-900, Oct. 1991.

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

LE ROMANCER, M.; NEDELLEC, M. Effect of plant genotype, virus isolate and temperature on the expression of the potato tuber necrotic ringspot disease (PTNRD). **Plant Pathology**, Oxford, v.46, n.1, p.104-11, Feb. 1997.

LORENZEN, J.; NOLTE, P.; MARTIN, D.; PASCHE, J.S.; GUDMESTAD, N.C. NE-11 represents a new strain variant class of Potato virus Y. **Archives of Virology**, New York, v.153, n.6, p.517-525, June 2008.

LORENZEN, J.H; PICHE, L.M.; GUDMESTAD, N.C.; MEACHAM, T.; SHIEL, P.A. Multiplex PCR assay to characterize Potato virus Y isolates and identify strain mixtures. **Plant Disease**, Saint Paul, v.90, n.10, p.935-940, Oct. 2006.

MAROUELLI, W. A.; GUIMARÃES, T. G. **Irrigação na cultura da batata**. Itapetininga, SP: Associação Brasileira da Batata, 2006.

MORAES, F.H.R. **Caracterização de isolados do Vírus Y (Potato virus Y-PVY), provenientes de batata no Brasil**. 2003. 124 p. Tese (Doutorado em Fitopatologia)–Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

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

MORAVEC, T.; CEROVSKÁ, N.; BOONHAM, N. The detection of recombinant, tuber necrotizing isolates of Potato virus Y (PVY^{NTN}) using a three-primer PCR based in the coat protein gene. **Journal of Virological Methods**, London, v.109, n.1, p.63-68, Feb. 2003.

MURPHY, F.A.; FAUQUET, C.; BISHOP, D.H.L.; GHABRIAL, S.A.; JARVIS, A.W.; MARTELLI, G.P.; MAYO, M.A.; SUMMERS, M.D. Virus Taxonomy: classification and nomenclature of viruses. In: REPORT OF THE INTERNATIONAL COMMITTEE ON TAXONOMY OF VIRUSES, 6., 1995. **Proceeding...**Vienna: Springer-Verlage, 1995. p.348-358.

NIE, X.; SINGH, R.P. Evolution on North American PVY^{NTN} strains Tu 660 from local PVYN by mutation rather than recombination. **Virus Genes**, Norwell, v.26, n.1, p.39-47, Apr. 2003a.

NIE, X.; SINGH, R.P. Specific differentiation of recombinant PVY^{N:O} and PVY^{NTN} isolates by multiplex RT-PCR. **Journal of Virological Methods**, London, v.113, n.2, p.69-77, Apr. 2003b.

NIE, X.; SINGH, R.R. Probable geographical grouping of PVY^N and PVY^{NTN} based on sequence variation in P1 and 5'-UTR of PVY genome and methods for differentiating North American PVY^{NTN}. **Journal of Virological Methods**, London, v.103, n.1, p.154-156, Feb. 2002.

NIELSEN, S.L. Ringpletnekroesyge i kartoffelknolde (Tuber necrotic ringspot disease in potato). **Tidsskrift for Planteavl**, Beretning, v.86, n.1, p.201-202, Jan. 1992.

NOLTE, P. Effect of Seedborne *Potato virus Y* on Performance of Russet Burbank, Russet Norkotah, and Shepody Potato. **Plant Disease**, Saint Paul, v.88, n.3, p.248-252, Mar. 2004.

OGAWA, T.; TOMITAKA, Y.; NAKAGAWA, A.; OHSHIMA, K. Genetic structure of a population of *Potato virus Y* inducing potato tuber necrotic ringspot disease in Japan: comparison with North American and European populations. **Virus Research**, Amsterdam, v.131, n.2, p.199-212, Sept. 2008.

OHSHIMA, K.; SAKO, K.; HIRAIISHI, C.; NAKAGAWA, A.; MATSUO, K.; OGAWA, T.; SHIKATA, E.; SAKO, N. Potato tuber necrotic ringspot disease occurring in Japan: Its association with *Potato virus Y* necrotic strain. **Plant Disease**, Saint Paul, v.84, n.11, p.1109-1115, Nov. 2000.

PEREIRA, E. M. S.; QUEIROZ LUZ, J. M.; MOURA, C. C.; **A batata e seus benefícios nutricionais**. Uberlândia: Associação Brasileira da Batata, 2005.

PERTERS, D.; JONES, R. A. C. Potato leafroll virus. In: HOOKER, W. J. **Compendium of potato diseases**. Saint Paul: American Phytopathological Society, 1981. p. 68-70.

PICHE, L.M.; SINGH, R.P.; NEI, X.; GUDMESTAD, N.C. Diversity among *Potato virus Y* isolates obtained from Potatoes Grown in the United States. **Virology**, New York, v.94, n.12, p.1368-1375, Dec. 2004.

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

RIGOTTI, S.; GUGERLI, P. Rapid identification of *Potato virus Y* strains by one-step triplex RT-PCR. **Journal of Virological Methods**, London, v.140, n.1, p.90-94, Feb. 2007.

SALAS, F.J.S. **Comportamento de *Myzus persicae* (SULZER) (HEMIPTERA: APHIDIDAE) e transmissão de estirpes de *Potato virus Y* em diferentes cultivares de batata.** 2004. 122 p. Tese (Doutorado em Entomologia Agrícola)–Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, SP.

SALAS, F.J.S.; FERES, A. Resistência de variedades comerciais de batata a transmissão do *Potato virus Y* pelo vetor *Myzus persicae*. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.71, n.2, p.167-173, jul./dez. 2004.

SCHIESSENDOPPLER, E. PVY as causal agent of tuber necrotic ring disease. In: Mackerron, D.K.L (Ed.). **Proceedings of the Triennial Conference of the European Association for Potato Research.** Edinburgh: European Association for Potato Research, 1990. p.194-195.

SCHUBERT, J.; FORMITCHEVA, V.; WISNIEWSKA, J.S. Differentiation of *Potato virus Y* strains using improved sets of diagnostic PCR-primers. **Journal of Virological Methods**, London, v.140, n.1, p.66-74, Jan. 2007.

SHUKLA, D.D.; STRIKE, P.M.; TRACY, S.L.; GOUGH, K.H.; WARD, C.W. The Nand C-termini of the coat proteins of *Potyvirus* are surface located and the N-terminus contains the major virus-specific epitopes. **Journal of General Virology**, London, v.69, n.3, p.1497-1508, Mar.1984.

SINGH, R. P. Reverse-transcription polymerase chain reaction for the detection of viruses from plants and aphids. **Journal of Virological Methods**, London, v.74, n.2, p.125-138, Mar. 1998.

SINGH, R.P.; MCLAREN, D.L.; NIE, X.; SINGH, M. Possible escape of a recombinant isolate of Potato virus Y by serological indexing and methods of its detection. **Plant Diseases**, Saint Paul, v.87, p.679-685, 2003.

SOUZA-DIAS, J.A.C. Doenças causadas por Vírus em Batata. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v.18, n.184, p.54-63, ago. 1996.

TRIBODET, M.; GLAIS, L.; KERLAN, C.; JACQUOT, E. Characterization of Potato virus Y (PVY) molecular determinants involved in the vein necrosis

symptom induced by PVY^N isolates in infected *Nicotiana tabacum* cv. Xanthi. **Journal of General Virology**, London, v.86, n.12, p.2101-2105, Dec. 2005.

TRUTA, A.A.C.; SOUZA, A.R.R.; NASCIMENTO, A.V.S.; PEREIRA, R.C.; PINTO, C.M.F.; BROMMONSCHENKEL, S.H.; CARVALHO, M.G.; ZERBINI, F.M. Identidade e propriedades de isolados de potyvirus provenientes de *Capsicum* spp. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.29, n.2, p.160-168, mar./abr. 2004.

WEIDEMANN, H.L. Importance and control of potato virus Y^N (PVY^N) in seed potato production. **Potato Research**, Wageningen, v.31, n.1, p.85-94, Mar. 1988.

WEIDEMANN, H.L. Ringsymptome an kartoffelknollen 'Kartoffelvirus Y' als vermutliche Ursache. **Der Kartoffelbau**, Gelsenkirchen-Buer, v.36, n.2, p.356-357, Mar. 1985.

WEILGUNY, H.; SINGH, R.P. Separation of Slovenian isolates of PVY^{NTN} from the North American isolates of PVY^N by a 3-primer PCR. **Journal of Virological Methods**, London, v.71, n.1, p.57-68, Mar. 1998.

7 ANEXOS

ANEXO A	Páginas
FIGURA 1A Alinhamento das sequências de nucleotídeos do gene da capa protéica dos catorze isolados de PVY ^{NTN} estudados, doze isolados desta mesma variante e quatro isolado de PVY ^N disponíveis no GenBank	40
FIGURA 2A Alinhamento das sequências de aminoácidos do gene da capa protéica dos catorze isolados de PVY ^{NTN} estudados, doze isolados desta mesma variante e quatro isolado de PVY ^N disponíveis no GenBank.....	52

```

GO-AST      GGAAATGACACAATCGATACAGGAGGAAGCACTAAGAAGGATGCAAAAACAAGAGCAAGGT 60
SA-AST      GGAAATGACACAATCGATACAGGAGGAAGCACTAAGAAGGATGCAAAAACAAGAGCAAGGT 60
MF-AST      GGAAATGACACAATCGATACAGGAGGAAGCACTAAGAAGGATGCAAAAACAAGAGCAAGGT 60
SP-MO       GGAAATGACACACTCGATACAGGAGGAAGCACTAAGAAGGATGCAAAAACAAGAGCAATGT 60
IP-MON      GGAAATGACACACTCGATACAGGAGGAAGCTCTAAGAAGGATGCAAAAACAAGAGCAAGGT 60
PA-AGA2     GGAAATGACACACTCGATACAGGAGGAAGCCCTAAGAAGGATGCAAAAACAAGAGCAAGGT 60
PA-AGA1     GGAAATGACACACTCGATACAGGAGGAAGCACTAAGAAGGATGCAAAAACAAGAGCAAGGT 60
ES-AGA      GGAAATGACACAATCGATACAGGAGGAAGCTCTAAGAAGGATGCAAAAACAAGAGCAAGGT 60
AN-AGA      GGAAATGACACAGTTCGATACAGGAGGAAGCTCTAAGAAGGATGCAAAAACAAGAGCAAGGT 60
LA-MON      GGAAATGACACACTCGATGCAGGAGGAAGCACTAAGAAGGATGCAAAAACAAGAGCAATGG 60
IP-MAR      GGAAATGACACCATCGATGCAGGAGGAAGCACTAAGAAGGATGCAAAAACAAGAGCAAGGC 60
MU-AGA      GGAAATGACACACTCGATGCAGGAGGAAGCCCTAAGAAGGATGCAAAAACAAGAGCAAGGT 60
AJ390296    GGAAATGACACAATCGATGCAGGAGGAAGCACTAAGAAGGATGCAAAAACAAGAGCAAGGT 60
Z70237      GGAAATGACACAATTCGATGCAGGAGGAAGCACTAAGAAGGATGCAAAAACAAGAGCAAGGT 60
X92078      GGAAATGACACAATTCGATGCAGGAGGAAGCACTAAGAAGGATGCAAAAACAAGAGCAAGGT 60
X79305      GGAAATGACACAATTCGATGCAGGAGGAAGCACTAAGAAGGATGCAAAAACAAGAGCAAGGT 60
AF325927    GGAAATGACACAATCGATGCAGGAGGAAGCACTAAGAAGGATGCAAAAACAAGAGCAAGGT 60
AY884982    GGAAATGACACAATCGATGCAGGAGGAAGCACTAAGAAGGATGCAAAAACAAGAGCAAGGT 60
EF027892    GGAAATGACACAATCGATGCAGGAGGAAGCACTAAGAAGGATGCAAAAACAAGAGCAAGGT 60
AY601680    GGAAATGACACAATCGATGCAGGAGGAAGCACTAAGAAGGATGCAAAAACAAGAGCAAGGT 60
AB295479    GGAAATGACACAATCGATGCAGGAGGAAGCACTAAGAAGGATGCAAAAACAAGAGCAAGGT 60
EF027879    GGAAATGACACAATCGATGCAGGAGGAAGCACTAAGAAGGATGCAAAAACAAGAGCAAGGT 60
AB331547    GGAAATGACACAATCGATGCAGGAGGAAGCACTAAGAAAGATGCAAAAACAAGAGCAAGGT 60
AJ390295    GGAAATGACACAATCGATGCAGGAGGAAGCACTAAGAAAGATGCAAAAACAAGAGCAAGGT 60
EF027891    GGAAATGACACAATCGATGCAGGAGGAAGCACTAAGAAAGATGCAAAAACAAGAGCAAGGT 60
AF255660    GGAAATGACACAATCGATACAGGAGGAAGCACTAAGAAGGATGCAAAAACAAGAGCAAGGT 60
AJ133454    GGAAATGACACAATCGATGCAGGAGGAAGCACTAAGAAGGATGCAAAAACAAGAGCAAGGT 60
BR-AGA      GGAAATGACACAATCGATGCAGGAGGAATCACTAAGAAGGATGCAAAAACAAGAGCAATGT 60
AM411503    GGAAATGACACAATCGATGCAGGAGGAAGCACTAAGAAGGAAGCAAAAACAAGAGCAAGGT 60
SGS-MO      GGAAATGACACAGTTCGATGCAGGAGGAGTCACTAAGAAGGATGCAAAAACAAGAGCAAGGT 60
***** * ** * ***** * ***** * ***** * ***** *

```

“...Continua...”

FIGURA 1A Alinhamento das seqüências de nucleotídeos do gene da capa protéica dos catorze isolados de PVY^{NTN} estudados, doze isolados desta mesma variante e quatro isolado de PVY^N disponíveis no GenBank.

FIGURA 1A “CONT.”

GO-AST	AGCATTCAACCAAATCTCAACAAGGAAAAGGAAAAGGACGTGAATGTTGGAACATCTGGA	120
SA-AST	AGCATTCAACCAAATCTCAACAAGGAAAAGGAAAAGGACGTGAATGTTGGAACATCTGGA	120
MF-AST	AGCATTCAACCAAATCTCAACAAGGAAAAGGAAAAGGACGTGAATGTTGGAACATCTGGA	120
SP-MO	AGCATTCAACCAAATCTCAACAAGGAAAAGGAAAAGGACGTGAATGTTGGAACATCTGGA	120
IP-MON	AGCATTCAACCAAATCTCAACAAGGAAAAGGAAAAGGACGTGAATGTTGGAACATCTGGA	120
PA-AGA2	AGCATTCAACCAAATCTCAACAAGGAAAAGGAAAAGGACGTGAATGTTGGAACATCTGGA	120
PA-AGA1	AGCATTCAACCAAATCTCAACAAGGAAAAGGAAAAGGACGTGAATGTTGGAACATCTGGA	120
ES-AGA	AGCATTCAACCAAATCTCAACAAGGAAAAGGAAAAGGACGTGAATGTTGGAACATCTGGA	120
AN-AGA	AGCATTCAACCAAATCTCAACAAGGAAAAGGAAAAGGACGTGAATGTTGGAACATCTGGA	120
LA-MON	CGCATTCAACCAAATCTCAACAAGGAAAAGGAAAAGGACGTGAATGTTGGAACATCTGGA	120
IP-MAR	AGCATTCAACCAAATCTCAACAAGGAAAAGGAAAAGGACGTGAATGTTGGAACATCTGGA	120
MU-AGA	AGCATTCAACCAATTCTCAACAAGGAAAAGGAAAAGGACGTGAATGTTGGAACATCTGGA	120
AJ390296	AGCATTCAACCAAGTCTCAACAAGGAAAAGGAAAAGGACGTGAATGTTGGAACATCTGGA	120
Z70237	AGCATTCAACCAATTCTCAACAAGGAAAAGGAAAAGGACGTGAATGTTGGAACATCTGGA	120
X92078	AGCATTCAACCAATTCTCAACAAGGAAAAGGAAAAGGACGTGAATGTTGGAACATCTGGA	120
X79305	AGCATTCAACCAAATCTCAACAAGGAAAAGGAAAAGGACGTGAATGTTGGAACATCTGGA	120
AF325927	AGCATTCAACCAATTCTCAACAAGGAAAAGGAAAAGGACGTGAATGTTGGAACATCTGGA	120
AY884982	AGCATTCAACCAAGTCTCAACAAGGAAAAGGAAAAGGACGTGAATGTTGGAACATCTGGA	120
EF027892	AGCATTCAACCAAATCTCAACAAGGAAAAGGAAAAGGACGTGAATGTTGGAACATCTGGA	120
AY601680	AGCATTCAACCAAATCTCAACAAGGAAAAGGAAAAGGACGTGAATGTTGGAACATCTGGA	120
AB295479	AGCATTCAACCAAATCTCAACAAGGAAAAGGAAAAGGACGTGAATGTTGGAACATCTGGA	120
EF027879	AGCATTCAACCAAATCTCAACAAGGAAAAGGAAAAGGACGTGAATGTTGGAACATCTGGA	120
AB331547	AGCATTCAACCAAATCTCAACAAGGAAAAGGAAAAGGACGTGAATGTTGGAACATCTGGA	120
AJ390295	AGCATTCAACCAAATCTCAACAAGGAAAAGGAAAAGGACGTGAATGTTGGAACATCTGGA	120
EF027891	AGCATTCAACCAAATCTCAACAAGGAAAAGGAAAAGGACGTGAATGTTGGAACATCTGGA	120
AF255660	AGCATTCAACCAAAATCTCAACAAGGAAAAGGAAAAGGACGTGAATGTTGGAACATCTGGA	120
AJ133454	AGCATTCAACCAAATCTCAACAAGGAAAAGGAAAAGGACGTGAATGTTGGAACATCTGGA	120
BR-AGA	AGCATTCAACCAAAGTCTCAACAAGGAAAAGGAAAAGGACGTGAATGTTGGAACATCTGGA	120
AM411503	AGCATTCAACCAAATCTCAACAAGGAAAAGGAAAAGGACGTGAATGTTGGAACATCTGGA	120
SGS-MO	AGCATTCAACCAAATCTCAACAAGGAGAAGAAGAAGGAGATGAATGTTGAAACATCGCGA	120
	***** ** * ***** ** * ***** ***** ***** **	

“...Continua...”

FIGURA 1A “CONT.”

GO-AST ACTCATACTGTGCCACGAATTAGAGCTATCACGTCCAAAATGAAAATGCCCAAGAGTAAA 180
SA-AST ACTCATACTGTGCCACGAATTAGAGCTATCACGTCCAAAATGAAAATGCCCAAGAGTAAA 180
MF-AST ACTCATACTGTGCCACGAATTAGAGCTATCACGTCCAAAATGAAAATGCCCAAGAGTAAA 180
SP-MO ACTCATACTGTGCCACGAATTAGAGCTATCACGTCCAAAATGAAAATGCCCAAGAGTAAA 180
IP-MON ACTCATACTGTGCCACGAATTAGAGCTATCACGTCCAAAATGAAAATGCCCAAGAGTAAA 180
PA-AGA2 ACTCATACTGTGCCACGAATTAGAGCTATCACGTCCAAAATGAAAATGCCCAAGAGTAAA 180
PA-AGA1 ACTCATACTGTGCCACGAATTAGAGCTATCACGTCCAAAATGAAAATGCCCAAGAGTAAA 180
ES-AGA ACTCATACTGTGCCACGAATTAGAGCTATCACGTCCAAAATGAAAATGCCCAAGAGTAAA 180
AN-AGA ACTCATACTGTGCCACGAATTAGAGCTATCACGTCCAAAATGAGAATGCCCAAGAGTAAA 180
LA-MON ACTTATACTGTGCCACGAATTAAGCTATCACGTCCAAAATGAAAATGCCCAAGAGTAAA 180
IP-MAR ACTCATACTGTGCCACGAATTAAGCTATCACGTCCAAAATGAGAATGCCCAAGAGTAAA 180
MU-AGA ACTCATACTGTGCCACGAATCAAAGCTATCACGTCCAAAATGAGAATGCCCAAGAGTAAA 180
AJ390296 ACTCATACTGTGCCACGAATTAAGCTATCACGTCCAAAATGAGAATGCCCAAGAGTAAA 180
Z70237 ACTCATACTGTGCCACGAATTAAGCTATCACGTCCAAAATGAGAATGCCCAAGAGTAAA 180
X92078 ACTCATACTGTGCCACGAATTAAGCTATCACGTCCAAAATGAGAATGCCCAAGAGTAAA 180
X79305 ACTCATACTGTGCCACGAATTAAGCTATCACGTCCAAAATGAGAATGCCCAAGAGTAAA 180
AF325927 ACTCATACTGTGCCACGAATTAAGCTATCACGTCCAAAATGAGAATGCCCAAGAGTAAA 180
AY884982 ACTCATACTGTGCCACGAATTAAGCTATCACGTCCAAAATGAGAATGCCCAAGAGTAAA 180
EF027892 ACTCATACTGTGCCACGAATTAAGCTATCACGTCCAAAATGAGAATGCCCAAGAGTAAA 180
AY601680 ACTCATACTGTGCCACGAATTAAGCTATCACGTCCAAAATGAGAATGCCCAAGAGTAAA 180
AB295479 ACTCATACTGTGCCACGAATTAAGCTATCACGTCCAAAATGAGAATGCCCAAGAGTAAA 180
EF027879 ACTCATACTGTGCCACGAATTAAGCTATCACGTCCAAAATGAGAATGCCCAAGAGTAAA 180
AB331547 ACTCACACTGTGCCACGAATTAAGCTATCACGTCCAAAATGAGAATGCCCAAGAGTAAAG 180
AJ390295 ACTCACACTGTGCCACGAATTAAGCTATCACGTCCAAAATGAGAATGCCCAAGAGTAAAG 180
EF027891 ACTCACACTGTGCCACGAATTAAGCTATCACGTCCAAAATGAGAATGCCCAAGAGTAAAG 180
AF255660 ACTCATACTGTGCCACGAATTAAGCTATCACGTCCAAAATGAGAATGCCCAAGAGTAAA 180
AJ133454 ACTCATACTGTGCCACGAATTAAGCTATCACGTCCAAAATGAGAATGCCCAAGAGTAAA 180
BR-AGA ACTCATACTGTGCCCGAATTAAGCTATCACGTCCAAAATGAGAATGCCCAAGAGTAAA 180
AM411503 ACTCATACTGTGCCACGAATTAAGCTATCACGTCCAAAATGAGAATGCCCAAGAGTAAA 180
SGS-MO ACTCACACTGTGCCACAAATTAGGCTTATCACGTCCAAATATGAGAATGCACAAGAGAAAA 180

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

“...Continua...”

FIGURA 1A “CONT.”

GO-AST	TCAAATACTCGAGCAACTCAATCACAGTTTGATACGTGGTATGAAGCGGTACAACCTTGCA	300
SA-AST	TCAAATACTCGAGCAACTCAATCACAGTTTGATACGTGGTATGAAGCGGTACAACCTTGCA	300
MF-AST	TCAAATACTCGAGCAACTCAATCACAGTTTGATACGTGGTATGAAGCGGTACAACCTTGCA	300
SP-MO	TCAAATACTCGAGCAACTCAATCACAGTTTGATACGTGGTATGAAGCGGTACAACCTTGCA	300
IP-MON	TCAAATACTCGAGCAACTCAATCACAGTTTGATACGTGGTATGAAGCGGTACAACCTTGCA	300
PA-AGA2	TCAAATACTCGAGCAACTCAATCACAGTTTGATACGTGGTATGAAGCGGTACAACCTTGCA	300
PA-AGA1	TCAAATACTCGAGCAACTCAATCACAGTTTGATACGTGGTATGAAGCGGTACAACCTTGCA	300
ES-AGA	TCAAATACTCGAGCAACTCAATCACAGTTTGATACGTGGTATGAAGCGGTACAACCTTGCA	300
AN-AGA	TCAAATACTCGAGCAACTCAATCACAGTTTGATACGTGGTATGAAGCGGTACAACCTTGCA	300
LA-MON	TCAAATACTCGAGCAACTCAATCACAGTTTGATACGTGGTATGAAGCGGTACAACCTTGCA	300
IP-MAR	TCAAATACTCGAGCAACTCAATCACAGTTTGATACGTGGTATGAAGCGGTACAACCTTGCA	300
MU-AGA	TCAAATACTCGAGCAACTCAATCACAGTTTGATACGTGGTATGAAGCGGTACAACCTTGCA	300
AJ390296	TCAAATACTCGAGCAACTCAATCACAGTTTGATACGTGGTATGAAGCAGTACAACCTTGCA	300
Z70237	TCAAATACTCGAGCAACTCAATCACAGTTTGATACGTGGTATGAAGCGGTACAACCTTGCA	300
X92078	TCAAATACTCGAGCAACTCAATCACAGTTTGATACGTGGTATGAAGCGGTACAACCTTGCA	300
X79305	TCAAATACTCGAGCAACTCAATCACAGTTTGATACGTGGTATGAAGCGGTACAACCTTGCA	300
AF325927	TCAAATACTCGAGCAACTCAATCACAGTTTGATACGTGGTATGAAGCGGTACAACCTTGCA	300
AY884982	TCAAATACTCGAGCAACTCAATCACAGTTTGATACGTGGTATGAAGCGGTACAACCTTGCA	300
EF027892	TCAAATACTCGAGCAACTCAATCACAGTTTGATACGTGGTATGAAGCGGTACAACCTTGCA	300
AY601680	TCAAATACTCGAGCAACTCAATCACAATTTGATACGTGGTATGAAGCGGTACAACCTTGCA	300
AB295479	TCAAATACTCGAGCAACTCAATCACAGTTTGATACGTGGTATGAAGCGGTACAACCTTGCA	300
EF027879	TCAAATACTCGAGCAACTCAATCACAGTTTGATACGTGGTATGAAGCGGTACAACCTTGCA	300
AB331547	TCAAATACTCGAGCAACTCAATCACAGTTTGATACATGGTATGAAGCAGTACAACCTTGCA	300
AJ390295	TCAAATACTCGAGCAACTCAATCACAGTTTGATACATGGTATGAAGCAGTACAACCTTGCA	300
EF027891	TCAAATACTCGAGCAACTCAATCACAGTTTGATACATGGTATGAAGCAGTACAACCTTGCA	300
AF255660	TCAAATACTCGAGCAACTCAATCACAGTTTGATACGTGGTATGAAGCAGTACAACCTTGCA	300
AJ133454	TCAAATACTCGAGCAACTCAATCACAGTTTGATACGTGGTATGAAGCAGTACAACCTTGCA	300
BR-AGA	TCAAATACTCGAGCAACTCAATCACAGTTTGATACGTGGTATGAAGCGGTACAACCTTGCA	300
AM411503	TCAAATACTCGAGCAACTCAATCACAGTTTGATACGTGGTATGAAGCGGTACAACCTTGCA	300
SGS-MO	TCAAATACTCGAGCAACTCAATCACAGTTTGATACGTGGTATGAAGCGGTACAACCTTGCA	300

“...Continua...”

FIGURA 1A “CONT.”

```
GO-AST      TACGACATAGGAGAACTGAAATGCCAACTGTGATGAATGGGCTTATGGTTTGGTGCATT 360
SA-AST      TACGACATAGGAGAACTGAAATGCCAACTGTGATGAATGGGCTTATGGTTTGGTGCATT 360
MF-AST      TACGACATAGGAGAACTGAAATGCCAACTGTGATGAATGGGCTTATGGTTTGGTGCATT 360
SP-MO       TACGACATAGGAGAACTGAAATGCCAACTGTGATGAATGGGCTTATGGTTTGGTGCATT 360
IP-MON      TACGACATAGGAGAACTGAAATGCCAACTGTGATGAATGGGCTTATGGTTTGGTGCATT 360
PA-AGA2     TACGACATAGGAGAACTGAAATGCCAACTGTGATGAATGGGCTTATGGTTTGGTGCATT 360
PA-AGA1     TACGACATAGGAGAACTGAAATGCCAACTGTGATGAATGGGCTTATGGTTTGGTGCATT 360
ES-AGA      TACGACATAGGAGAACTGAAATGCCAACTGTGATGAATGGGCTTATGGTTTGGTGCATT 360
AN-AGA      TACGACATAGGAGAACTGAAATGCCAACTGTGATGAATGGGCTTATGGTTTGGTGCATT 360
LA-MON      TACGACATAGGAGAACTGAAATGCCAACTGTGATGAATGGGCTTATGGTTTGGTGCATT 360
IP-MAR      TACGACATAGGAGAACTGAAATGCCAACTGTGATGAATGGGCTTATGGTTTGGTGCATT 360
MU-AGA      TACGACATAGGAGAACTGAAATGCCAACTGTGATGAATGGGCTTATGGTTTGGTGCATT 360
AJ390296    TACGACATAGGAGAACTGAAATGCCAACTGTGATGAATGGGCTTATGGTTTGGTGCATT 360
Z70237     TACGTCATAGGGGAACTGAAATGCCCACTGTGATGAATGGGCTTATGGTTTGGTGCATT 360
X92078     TACGTCATAGGGGAACTGAAATGCCCACTGTGATGAATGGGCTTATGGTTTGGTGCATT 360
X79305     TACGACATAGGAGAACTGAAATGCCAACTGTGATGAATGGGCTTATGGTTTGGTGCATT 360
AF325927   TACGACATAGGAGAACTGAAATGCCAACTGTGATGAATGGGCTTATGGTTTGGTGCATT 360
AY884982   TACGACATAGGAGAACTGAAATGCCAACTGTGATGAATGGGCTTATGGTTTGGTGCATT 360
EF027892   TACGACATAGGAGAACTGAAATGCCAACTGTGATGAATGGGCTTATGGTTTGGTGCATT 360
AY601680   TACGACATAGGAGAACTGAAATGCCAACTGTGATGAATGGGCTTATGGTTTGGTGCATT 360
AB295479   TACGACATAGGAGAACTGAAATGCCAACTGTGATGAATGGGCTTATGGTTTGGTGCATT 360
EF027879   TACGACATAGGAGAACTGAAATGCCAACTGTRATGAATGGGCTTATGGTTTGGTGCATT 360
AB331547   TACGACATAGGAGAACTGAAATGCCAACTGTGATGAATGGGCTTATGGTTTGGTGCATT 360
AJ390295   TACGACATAGGAGAACTGAAATGCCAACTGTGATGAATGGGCTTATGGTTTGGTGCATT 360
EF027891   TACGACATAGGAGAACTGAAATGCCAACTGTGATGAATGGGCTTATGGTTTGGTGCATT 360
AF255660   TACGACATAGGAGAACTGAAATGCCAACTGTGATGAATGGGCTTATGGTTTGGTGCATT 360
AJ133454   TACGACATAGGAGAACTGAAATGCCAACTGTGATGAATGGGCTTATGGTTTGGTGCATT 360
BR-AGA     TACGACATAGGAGAACTGAAATGCCAACTGTGATGAATGGGCTTATGGTTTGGTGCATT 360
AM411503   TACGACATAGGAGAACTGAAATGCCAACTGTGATGAATGGGCTTATGGTTTGGTGCATT 360
SGS-MO     TACGACATGGGAGAACTGAAATGCCAACTGTGATGAATGGGCTTATGGTTTGGTGCATT 360
**** ** * ***** ** ** *****
```

“...Continua...”

FIGURA 1A “CONT.”

GO-AST	GAAAATGGAACCTCGCCAAACATCAACGGAGTTTGGGTTATGATGGATGGAGATGAACAA	420
SA-AST	GAAAATGGAACCTCGCCAAACATCAACGGAGTTTGGGTTATGATGGATGGAGATGAACAA	420
MF-AST	GAAAATGGAACCTCGCCAAACATCAACGGAGTTTGGGTTATGATGGATGGAGATGAACAA	420
SP-MO	GAAAATGGAACCTCGCCAAACATCAACGGAGTTTGGGTTATGATGGATGGAGATGAACAA	420
IP-MON	GAAAATGGAACCTCGCCAAACATCAACGGAGTTTGGGTTATGATGGATGGAGATGAACAA	420
PA-AGA2	GAAAATGGAACCTCGCCAAACATCAACGGAGTTTGGGTTATGATGGATGGAGATGAACAA	420
PA-AGA1	GAAAATGGAACCTCGCCAAACATCAACGGAGTTTGGGTTATGATGGATGGAGATGAACAA	420
ES-AGA	GAAAATGGAACCTCGCCAAACATCAACGGAGTTTGGGTTATGATGGATGGAGATGAACAA	420
AN-AGA	GAAAATGGAACCTCGCCAAACATCAACGGAGTTTGGGTTATGATGGATGGAGATGAACAA	420
LA-MON	GAAAATGGAACCTCGCCAAACATCAACGGAGTTTGGGTTATGATGGATGGAGATGAACAA	420
IP-MAR	GAAAATGGAACCTCGCCAAACATCAACGGAGTTTGGGTTATGATGGATGGAGATGAACAA	420
MU-AGA	GAAAATGGAACCTCGCCAAACATCAACGGAGTTTGGGTTATGATGGATGGAGATGAACAA	420
AJ390296	GAAAATGGAACCTCGCCAAACGTCACCGGAGTTTGGGTTATGATGGATGGGAATGAACAA	420
Z70237	GAAAATGGAACCTCGCCAAACATCAACGGAGTTTGGGTTATGATGGATGGAGATGAACAA	420
X92078	GAAAATGGAACCTCGCCAAACATCAACGGAGTTTGGGTTATGATGGATGGAGATGAACAA	420
X79305	GAAAATGGAACCTCGCCAAACATCAACGGAGTTTGGGTTATGATGGATGGAGATGAACAA	420
AF325927	GAAAATGGAACCTCGCCAAACATCAACGGA-TTTGGGTTATGATGGATGGAGATGAACAA	419
AY884982	GAAAATGGAACCTCGCCAAACATCAACGGAGTTTGGGTTATGATGGATGGAGATGAACAA	420
EF027892	GAAAATGGAACCTCGCCAAACATCAACGGAGTTTGGGTTATGATGGATGGAGATGAACAA	420
AY601680	GAAAATGGAACCTCGCCAAACATCAACGGAGTTTGGGTTATGATGGATGGAGATGAACAA	420
AB295479	GAAAATGGAACCTCGCCAAACATCAACGGAGTTTGGGTTATGATGGATGGAGATGAACAA	420
EF027879	GAAAATGGAACCTCGCCAAACATCAACGGAGTTTGGGTTATGATGGATGGAGATGAACAA	420
AB331547	GAAAATGGAACCTCGCCAAATATCAATGGAGTTTGGGTTATGATGGATGGAGATGAACAA	420
AJ390295	GAAAATGGAACCTCGCCAAATATCAATGGAGTTTGGGTTATGATGGATGGAGATGAACAA	420
EF027891	GAAAATGGAACCTCGCCAAATATCAATGGAGTTTGGGTTATGATGGATGGAGATGAACAA	420
AF255660	GAAAATGGAACCTCGCCAAACATCAACGGAGTTTGGGTTATGATGGATGGAGATGAACAA	420
AJ133454	GAAAATGGAACCTCGCCAAACATCAACGGAGTTTGGGTTATGATGGATGGAGATGAACAA	420
BR-AGA	GAAAATGGAACCTCGCCAAACATCAACGGAGTTTGGGTTATGATGGATGGAGATGAACAA	420
AM411503	GAAAATGGAACCTCGCCAAACATCAACGGAGTTTGGGTTATGATGGATGGAGATGAACAA	420
SGS-MO	GAAAATGGAACCTCGCCAAACATCAACGGAGTTTGGGTTATGATGGATGGAGATGAACAA	420

“...Continua...”

FIGURA 1A “CONT.”

```
GO-AST      GTCGAATACCCACTGAAACCAATCGTTGAGAATGCAAAACCAACACTTAGGCAAATCATG 480
SA-AST      GTCGAATACCCACTGAAACCAATCGTTGAGAATGCAAAACCAACACTTAGGCAAATCATG 480
MF-AST      GTCGAATACCCACTGAAACCAATCGTTGAGAATGCAAAACCAACACTTAGGCAAATCATG 480
SP-MO       GTCGAATACCCACTGAAACCAATCGTTGAGAATGCAAAACCAACACTTAGGCAAATCATG 480
IP-MON      GTCGAATACCCACTGAAACCAATCGTTGAGAATGCAAAACCAACACTTAGGCAAATCATG 480
PA-AGA2     GTCGAATACCCACTGAAACCAATCGTTGAGAATGCAAAACCAACACTTAGGCAAATCATG 480
PA-AGA1     GTCGAATACCCACTGAAACCAATCGTTGAGAATGCAAAACCAACACTTAGGCAAATCATG 480
ES-AGA      GTCGAATACCCACTGAAACCAATCGTTGAGAATGCAAAACCAACACTTAGGCAAATCATG 480
AN-AGA      GTCGAATACCCACTGAAACCAATCGTTGAGAATGCAAAACCAACACTTAGGCAAATCATG 480
LA-MON      GTCGAATACCCACTGAAACCAATCGTTGAGAATGCAAAACCAACACTTAGGCAAATCATG 480
IP-MAR      GTCGAATACCCACTGAAACCAATCGTTGAGAATGCAAAACCAACACTTAGGCAAATCATG 480
MU-AGA      GTCGAATACCCGTTGAAACCAATCGTTGAGAATGCAAAACCAACCCTTAGGCAAATCATG 480
AJ390296    GTTGAGTACCCGTTGAAACCAATCGTTGAGAATGCAAAACCAACCCTTAGGCAAATCATG 480
Z70237      GTCGAATACCCACTGAAACCAATCGTTGAGAATGCAAAACCAACACTTAGGCAAATCATG 480
X92078      GTCGAATACCCACTGAAACCAATCGTTGAGAATGCAAAACCAACACTTAGGCAAATCATG 480
X79305      GTCGAATACCCACTGAAACCAATCGTTGAGAATGCAAAACCAACCCTTAGGCAAATCATG 480
AF325927    GTCGAATACCCACTGAAACCAATCGTTGAGAATGCAAAACCAACACTTAGGCAAATCATG 479
AY884982    GTCGAATACCCACTGAAACCAATCGTTGAGAATGCAAAACCAACACTTAGGCAAATCATG 480
EF027892    GTCGAATACCCACTGAAACCAATCGTTGAGAATGCAAAACCAACACTTAGGCAAATCATG 480
AY601680    GTCGAATACCCACTGAAACCAATCGTTGAGAATGCAAAACCAACACTTAGGCAAATCATG 480
AB295479    GTCGAATACCCACTGAAACCAATCGTTGAGAATGCAAAACCAACACTTAGGCAAATCATG 480
EF027879    GTCGAATACCCACTGAAACCAATCGTTGAGAATGCAAAACCAACACTTAGGCAAATCATG 480
AB331547    ATCGAATACCCACTGAAACCAATCGTTGAGAATGCAAAACCAACACTTAGGCAAATCATG 480
AJ390295    GTCGAATACCCACTGAAACCAATCGTTGAGAATGCAAAACCAACACTTAGGCAAATCATG 480
EF027891    GTCGAGTACCCACTGAAACCAATCGTTGAGAATGCAAAACCAACACTTAGGCAAATCATG 480
AF255660    GTCGAATACCCACTGAAACCAATCGTTGAGAATGCAAAACCAACACTTAGGCAAATCATG 480
AJ133454    GTCGAATACCCACTGAAACCAATCGTTGAGAATGCAAAACCAACACTTAGGCAAATCATG 480
BR-AGA      ATCGAATACCCACTGAAACCAATCGTTGAGAATGCAAAACCAACACTTAGGCAAATCATG 480
AM411503    GTCGAATACCCACTGAAACCAATCGTTGAGAATGCAAAACCAACACTTAGGCAAATCATG 480
SGS-MO      GTCGAATACCCACTGAAACCAATCGTTGAGAATGCAAAACCAACACTTAGGCAAATCATG 480
```

* ** *****

“...Continua...”

FIGURA 1A “CONT.”

GO-AST	GCACATTTCTCAGATGTTGCAGAAGCGTATATAGAAATGCGCAACAAAAAGGAACCATAT	540
SA-AST	GCACATTTCTCAGATGTTGCAGAAGCGTATATAGAAATGCGCAACAAAAAGGAACCATAT	540
MF-AST	GCACATTTCTCAGATGTTGCAGAAGCGTATATAGAAATGCGCAACAAAAAGGAACCATAT	540
SP-MO	GCACATTTCTCAGATGTTGCAGAAGCGTATATAGAAATGCGCAACAAAAAGGAACCATAT	540
IP-MON	GCACATTTCTCAGATGTTGCAGAAGCGTATATAGAAATGCGCAACAAAAAGGAACCATAT	540
PA-AGA2	GCACATTTCTCAGATGTTGCAGAAGCGTATATAGAAATGCGCAACAAAAAGGAACCATAT	540
PA-AGA1	GCACATTTCTCAGATGTTGCAGAAGCGTATATAGAAATGCGCAACAAAAAGGAACCATAT	540
ES-AGA	GCACATTTCTCAGATGTTGCAGAAGCGTATATAGAAATGCGCAACAAAAAGGAACCATAT	540
AN-AGA	GCACATTTCTCAGATGTTGCAGAAGCGTATATAGAAATGCGCAACAAAAAGGAACCATAT	540
LA-MON	GCACATTTCTCAGATGTTGCAGAAGCGTATATAGAAATGCGCAACAAAAAGGAACCATAT	540
IP-MAR	GCACATTTCTCAGATGTTGCAGAAGCGTATATAGAAATGCGCAACAAAAAGGAACCATAT	540
MU-AGA	GCACATTTCTCTGATGTTGCAGAAGCGTATATAGAAATGCGCAACAAAAAGGAACCATAT	540
AJ390296	GCACATTTCTCAGATGTTGCAGAAGCGTATATAGAAATGCGCAACAAAAAGGAACCATAT	540
Z70237	GCACATTTCTCAGATGTTGCAGAAGCGTATATAGAAATGCGCAACAAAAAGGAACCATAT	540
X92078	GCACATTTCTCAGATGTTGCAGAAGCGTATATAGAAATGCGCAACAAAAAGGAACCATAT	540
X79305	GCACATTTCTCAGATGTTGCAGAAGCGTATATAGAAATGCGCAACAAAAAGGAACCATAT	540
AF325927	GCACATTTCTCAGATGTTGCAGAAGCGTATATAGAAATGCGCAACAAAAAGGAACCATAT	539
AY884982	GCACATTTCTCAGATGTTGCAGAAGCGTATATAGAAATGCGCAACAAAAAGGAACCATAT	540
EF027892	GCACATTTCTCAGATGTTGCAGAAGCGTATATAGAAATGCGCAACAAAAAGGAACCATAT	540
AY601680	GCACATTTCTCAGATGTTGCAGAAGCGTATATAGAAATGCGCAACAAAAAGGAACCATAT	540
AB295479	GCACATTTCTCAGATGTTGCAGAAGCGTATATAGAAATGCGCAACAAAAAGGAACCATAT	540
EF027879	GCACATTTCTCAGATGTTGCAGAAGCGTATATAGAAATGCGCAACAAAAAGGAACCATAT	540
AB331547	GCACATTTCTCAGATGTTGCAGAAGCGTATATAGAAATGCGCAACAAAAAGGAACCATAT	540
AJ390295	GCACATTTCTCAGATGTTGCAGAAGCGTATATAGAAATGCGCAACAAAAAGGAACCATAT	540
EF027891	GCACATTTCTCAGATGTTGCAGAAGCGTATATAGAAATGCGCAACAAAAAGGAACCATAT	540
AF255660	GCACATTTCTCAGATGTTGCAGAAGCGTATATAGAAATGCGCAACAAAAAGGAACCATAT	540
AJ133454	GCACATTTCTCAGATGTTGCAGAAGCGTATATAGAAATGCGCAACAAAAAGGAACCATAT	540
BR-AGA	GCACATTTCTCAGATGTTGCAGAAGCGTATATAGAAATGCGCAACAAAAAGGAACCATAT	540
AM411503	GCACATTTCTCAGATGTTGCAGAAGCGTATATAGAAATGCGCAACAAAAAGGAACCATAT	540
SGS-MO	GCACATTTCTCAGATGTTGCAGAAGCGTATATAGAAATGCGCAACAAAAAGGAACCATAT	540

“...Continua...”

FIGURA 1A “CONT.”

```
GO-AST      ATGCCACGATATGGTTTAGTTTCGTAATCTGCGCGATGGAAGTTTGGCTCGCTATGCTTTT 600
SA-AST      ATGCCACGATATGGTTTAGTTTCGTAATCTGCGCGATGGAAGTTTGGCTCGCTATGCTTTT 600
MF-AST      ATGCCACGATATGGTTTAGTTTCGTAATCTGCGCGATGGAAGTTTGGCTCGCTATGCTTTT 600
SP-MO       ATGCCACGATATGGTTTAGTTTCGTAATCTGCGCGATGGAAGTTTGGCTCGCTATGCTTTT 600
IP-MON      ATGCCACGATATGGTTTAGTTTCGTAATCTGCGCGATGGAAGTTTGGCTCGCTATGCTTTT 600
PA-AGA2     ATGCCACGATATGGTTTAGTTTCGTAATCTGCGCGATGGAAGTTTGGCTCGCTATGCTTTT 600
PA-AGA1     ATGCCACGATATGGTTTAGTTTCGTAATCTGCGCGATGGAAGTTTGGCTCGCTATGCTTTT 600
ES-AGA     ATGCCACGATATGGTTTAGTTTCGTAATCTGCGCGATGGAAGTTTGGCTCGCTATGCTTTT 600
AN-AGA     ATGCCACGATATGGTTTAGTTTCGTAATCTGCGCGATGGAAGTTTGGCTCGCTATGCTTTT 600
LA-MON     ATGCCACGATATGGTTTAGTTTCGTAATCTGCGCGATGGAAGTTTGGCTCGCTATGCTTTT 600
IP-MAR     ATGCCACGATATGGTTTAGTTTCGTAATCTGCGCGATGGAAGTTTGGCTCGCTATGCTTTT 600
MU-AGA     ATGCCACGATATGGTTTAAATTCGAAATCTGCGGGATGTGGGTTTAGCGCGTTATGCCTTT 600
AJ390296   ATGCCACGATATGGTTTAAATTCGAAATCTGCGGGATGTGGGTTTAGCGCGTTATGCCTTT 600
Z70237     ATGCCACGATATGGTTTAGTTTCGTAATCTGCGCGATGGAAGTTTGGCTCGGTATGCTTTT 600
X92078     ATGCCACGATATGGTTTAGTTTCGTAATCTGCGCGATGGAAGTTTGGCTCGGTATGCTTTT 600
X79305     ATGCCACGATATGGTTTAGTTTCGTAATCTGCGCGATGGAAGTTTGGCTCGCTATGCTTTT 600
AF325927   ATGCCACGATATGGTTTAGTTTCGTAATCTGCGCGATGGAAGTTTGGCTCGCTATGCTTTT 599
AY884982   ATGCCACGATATGGTTTAGTTTCGTAATCTGCGCGATGGAAGTTTGGCTCGCTATGCTTTT 600
EF027892   ATGCCACGATATGGTTTAGTTTCGTAATCTGCGCGATGGAAGTTTGGCTCGCTATGCTTTT 600
AY601680   ATGCCACGATATGGTTTAGTTTCGTAATCTGCGCGATGGAAGTTTGGCTCGCTATGCTTTT 600
AB295479   ATGCCACGATATGGTTTAGTTTCGTAATCTGCGCGATGGAAGTTTGGCTCGCTATGCTTTT 600
EF027879   ATGCCACGATATGGTTTAGTTTCGTAATCTGCGCGATGGAAGTTTGGCTCGCTATGCTTTT 600
AB331547   ATGCCACGATATGGTTTAGTTTCGTAATCTGCGCGATGGAAGTTTGGCTCGCTATGCTTTT 600
AJ390295   ATGCCACGATATGGTTTAGTTTCGTAATCTGCGCGATGGAAGTTTGGCTCGCTATGCTTTT 600
EF027891   ATGCCACGATATGGTTTAGTTTCGTAATCTGCGCGATGGAAGTTTGGCTCGCTATGCTTTT 600
AF255660   ATGCCACGATATGGTTTAGTTTCGTAATCTGCGCGATGGAAGTTTGGCTCGCTATGCTTTT 600
AJ133454   ATGCCACGATATGGTTTAGTTTCGTAATCTGCGCGATGGAAGTTTGGCTCGCTATGCTTTT 600
BR-AGA     ATGCCACGATATGGTTTAGTTTCGTAATCTGCGCGATGGAAGTTTGGCTCGCTATGCTTTT 600
AM411503   ATGCCACGATATGGTTTAGTTTCGTAATCTGCGCGATGGAAGTTTGGCTCGCTATGCTTTT 600
SGS-MO     ATGCCACGATATGGTTTAGTTTCGTAATTTGCGGAAGGAAGTTTGGCTCGCTATGCTTTT 600
*****
```

“...Continua...”

FIGURA 1A “CONT.”

```
GO-AST      GACTTTTATGAGGTCACATCACGAACACCAGTGAGGGCTAGGGAGGCGCACATTCAAATG 660
SA-AST      GACTTTTATGAGGTCACATCACGAACACCAGTGAGGGCTAGGGAGGCGCACATTCAAATG 660
MF-AST      GACTTTTATGAGGTCACATCACGAACACCAGTGAGGGCTAGGGAGGCGCACATTCAAATG 660
SP-MO       GACTTTTATGAGGTCACATCACGAACACCAGTGAGGGCTAGGGAGGCGCACATTCAAATG 660
IP-MON      GACTTTTATGAGGTCACATCACGAACACCAGTGAGGGCTAGGGAGGCGCACATTCAAATG 660
PA-AGA2     GACTTTTATGAGGTCACATCACGAACACCAGTGAGGGCTAGGGAGGCGCACATTCAAATG 660
PA-AGA1     GACTTTTATGAGGTCACATCACGAACACCAGTGAGGGCTAGGGAGGCGCACATTCAAATG 660
ES-AGA      GACTTTTATGAGGTCACATCACGAACACCAGTGAGGGCTAGGGAGGCGCACATTCAAATG 660
AN-AGA      GACTTTTATGAGGTCACATCACGAACACCAGTGAGGGCTAGGGAGGCGCACATTCAAATG 660
LA-MON      GACTTTTATGAGGTCACATCACGAACACCAGTGAGGGCTAGGGAGGCGCACATTCAAATG 660
IP-MAR      GACTTTTATGAGGTCACATCACGAACACCAGTGAGGGCTAGGGAGGCGCACATTCAAATG 660
MU-AGA      GACTTTTATGAGGTCACATCACGAACACCAGTGAGGGCTAGGGAGGCGCACATTCAAATG 660
AJ390296    GACTTTTATGAGGTCACATCACGAACACCAGTGAGGGCTAGGGAGGCGCACATTCAAATG 660
Z70237     GACTTTTATGAGGTCACATCACGAACACCAGTGAGGGCTAGGGAGGCGCACATCCAAATG 660
X92078     GACTTTTATGAGGTCACATCACGAACACCAGTGAGGGCTAGGGAGGCGCACATCCAAATG 660
X79305     GACTTTTATGAGGTCACATCACGAACACCAGTGAGGGCTAGGGAGGCGCACATTCAAATG 660
AF325927   GACTTTTATGAGGTCACATCACGAACACCAGTGAGGGCTAGGGAGGCGCACATTCAAATG 659
AY884982   GACTTTTATGAGGTCACATCACGAACACCAGTGAGGGCTAGGGAGGCGCACATTCAAATG 660
EF027892   GACTTTTATGAGGTCACATCACGAACACCAGTGAGGGCTAGGGAGGCGCACATTCAAATG 660
AY601680   GACTTTTATGAGGTCACATCACGAACACCAGTGAGGGCTAGGGAGGCGCACATTCAAATG 660
AB295479   GACTTTTATGAGGTCACATCACGAACACCAGTGAGGGCTAGGGAGGCGCACATTCAAATG 660
EF027879   GACTTTTATGAGGTCACATCACGAACACCAGTGAGGGCTAGGGAGGCGCACATTCAAATG 660
AB331547   GACTTTTATGAAGTTACATCACGGACACCAGTGAGGGCTAGAGAGGCACACATTCAAATG 660
AJ390295   GACTTTTATGAAGTTACATCACGGACACCAGTGAGGGCTAGAGAGGCACACATTCAAATG 660
EF027891   GACTTTTATGAAGTTACATCACGGACACCAGTGAGGGCTAGAGAGGCACATATTCAAATG 660
AF255660   GACTTTTATGAAGTTACATCACGGACACCAGTGAGGGCTAGAGAGGCACACATTCAAATG 660
AJ133454   GACTTTTATGAGGTCACATCACGAACACCAGTGAGGGCTAGGGAGGCGCACATTCAAATG 660
BR-AGA      GACTTTTATGAGGTCACATCACGAACACCAGTGAGGGCTAGGGAGGCGCACATTCAAATG 660
AM411503   GACTTTTATGAGGTCACATCACGAACACCAGTGAGGGCTAGGGAGGCGCACATTCAAATG 660
SGS-MO      GACTTTTATGAGGTCACATCACGAACACCAGTGAGGGCTAGGGAGGCGCACATTCAAATG 660
***** ** ***** ***** ** ** * ** * ** *
```

“...Continua...”

FIGURA 1A “CONT.”

GO-AST	AAGGCCGCAGCATTGAAATCAGCCCAACCTCGACTTTTCGGGTTGGACGGTGGCATCAGT	720
SA-AST	AAGGCCGCAGCATTGAAATCAGCCCAACCTCGACTTTTCGGGTTGGACGGTGGCATCAGT	720
MF-AST	AAGGCCGCAGCATTGAAATCAGCCCAACCTCGACTTTTCGGGTTGGACGGTGGCATCAGT	720
SP-MO	AAGGCCGCAGCATTGAAATCAGCCCAACCTCGACTTTTCGGGTTGGACGGTGGCATCAGT	720
IP-MON	AAGGCCGCAGCATTGAAATCAGCCCAACCTCGACTTTTCGGGTTGGACGGTGGCATCAGT	720
PA-AGA2	AAGGCCGCAGCATTGAAATCAGCCCAACCTCGACTTTTCGGGTTGGACGGTGGCATCAGT	720
PA-AGA1	AAGGCCGCAGCATTGAAATCAGCCCAACCTCGACTTTTCGGGTTGGACGGTGGCATCAGT	720
ES-AGA	AAGGCCGCAGCATTGAAATCAGCCCAACCTCGACTTTTCGGGTTGGACGGTGGCATCAGT	720
AN-AGA	AAGGCCGCAGCATTGAAATCAGCCCAACCTCGACTTTTCGGGTTGGACGGTGGCATCAGT	720
LA-MON	AAGGCCGCAGCATTGAAATCAGCCCAACCTCGACTTTTCGGGTTGGACGGTGGCATCAGT	720
IP-MAR	AAGGCCGCAGCATTGAAATCAGCCCAATCTCGACTTTTCGGGTTGGACGGTGGCATCAGT	720
MU-AGA	AAGGCCGCAGCATTGAAATCAGCCCAACCTCGACTTTTCGGGTTGGACGGTGGCATCAGT	720
AJ390296	AAGGCCGCAGCATTGAAATCAGCCCAACCTCGACTTTTCGGGTTGGACGGTGGCATCAGT	720
Z70237	AAGGCCGCAGCATTGAAATCAGCCCAACCTCGACTTTTCGGGTTGGACGGTGGCATCAGT	720
X92078	AAGGCCGCAGCATTGAAATCAGCCCAACCTCGACTTTTCGGGTTGGACGGTGGCATCAGT	720
X79305	AAGGCCGCAGCATTGAAATCAGCCCAACCTCGACTTTTCGGGTTGGACGGTGGCATCAGT	720
AF325927	AAGGCCGCAGCATTGAAATCAGCCCAACCTCGACTTTTCGGGTTGGACGGTGGCATCAGT	719
AY884982	AAGGCCGCAGCATTGAAATCAGCCCAACCTCGACTTTTCGGGTTGGACGGTGGCATTAGT	720
EF027892	AAGGCCGCAGCATTGAAATCAGCCCAACCTCGACTTTTCGGGTTGGACGGTGGCATCAGT	720
AY601680	AAGGCCGCAGCATTGAAATCAGCCCAACCTCGACTTTTCGGGTTGGACGGTGGCATCAGT	720
AB295479	AAGGCCGCAGCATTGAAATCAGCCCAATCTCGACTTTTCGGGTTGGACGGTGGCATCAGT	720
EF027879	AAGGCCGCAGCATTGAAATCAGCCCAATCTCGACTTTTCGGGTTGGACGGTGGCATCAGT	720
AB331547	AAGGCCGCAGCTTTAAAAATCAGCTCAATCTCGACTTTTCGGATTGGATGGTGGCATCAGT	720
AJ390295	AAGGCCGCAGCTTTAAAAATCAGCTCAATCTCGACTTTTCGGATTGGATGGTGGCATTAGT	720
EF027891	AAGGCCGCAGCTTTAAAAATCAGCTCAATCTCGACTTTTCGGATTGGATGGTGGCATTAGT	720
AF255660	AAGGCCGCAGCTTTAAAAATCAGCTCAATCTCGACTTTTCGGATTGGATGGTGGCATTAGT	720
AJ133454	AAGGCCGCAGCATTGAAATCAGCCCAATCTCGACTTTTCGGGTTGGACGGTGGCATCAGT	720
BR-AGA	AAGGCCGCAGCATTGAAATCAGCCCAATCTCGACTTTTCGGGTTGGACGGTGGCATCAGT	720
AM411503	AAGGCCGCAGCATTGAAATCAGCCCAATCTCGACTTTTCGGGTTGGACGGTGGCATCAGT	720
SGS-MO	AAGGCCGCAGCATTGAAATCAGCCCAATCTCGACTTTTCGGGTTGGACGGTGGCATCAGT	720

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

“...Continua...”

FIGURA 1A “CONT.”

GO-AST	ACACAAGAGGAGAACACAGAGAGGGCACACCACCGACGATGTCACTCAAAGTATGCATACT	780
SA-AST	ACACAAGAGGAGAACACAGAGAGGGCACACCACCGACGATGTCACTCAAAGTATGCATACT	780
MF-AST	ACACAAGAGGAGAACACAGAGAGGGCACACCACCGAGGATGTCACTCAAAGTATGCATACT	780
SP-MO	ACACAAGAGGAGAACACAGAGAGGGCACACCACCGAGGATGTCACTCAAAGTATGCATACT	780
IP-MON	ACACAAGAGGAGAACACAGAGAGGGCACACCACCGAGGATGTCACTACAAGTATGCATACT	780
PA-AGA2	ACACAAGAGGAGAACACAGAGAGGGCACACCACCGAGGATGTCACTACAAGTATGCATACT	780
PA-AGA1	ACACAAGAGGAGAACACAGAGAGGGCACACCACCGAGGATGTCACTACAAGTATGCATACT	780
ES-AGA	ACACAAGAGGAGAACACAGAGAGGGCACACCACCGAGGATGTCACTACAAGTATGCATACT	780
AN-AGA	ACACAAGAGGAGAACACAGAGAGGGCACACCACCGAGGATGTCACTACAAGTATGCATACT	780
LA-MON	ACACAAGAGGAGAACACAGAGAGGGCACACCACCGAGGATGTCTCTCAAAGTATGCATACT	780
IP-MAR	ACACAAGAGGAGAACACAGAGAGGGCACACCACCGAGGATGTCTCTCAAAGTATGCATACT	780
MU-AGA	ACACAAGAGGAGAACACAGAGAGGGCACACCACCGAGGATGTCTCTCAAAGTATGCATACT	780
AJ390296	ACACAAGAGGAGAACACAGAGAGGGCACACCACCGAGGATGTCTCTCAAAGTATGCATACT	780
Z70237	ACACAAGAGGAGAACACAGAGAGGGCACACCACCGAGGATGTCTCTCAAAGTATGCATACT	780
X92078	ACACAAGAGGAGAACACAGAGAGGGCACACCACCGAGGATGTCTCTCAAAGTATGCATACT	780
X79305	ACACAAGAGGAGAACACAGAGAGGGCACACCACCGAGGATGTCTCTCAAAGTATGCATACT	780
AF325927	ACACAAGAGGAGAACACAGAGAGGGCACACCACCGAGGATGTCTCTCAAAGTATGCATACT	779
AY884982	ACACAAGAGGAGAACACAGAGAGGGCACACCACCGAGGATGTCTCTCAAAGTATGCATACT	780
EF027892	ACACAAGAGGAGAACACAGAGAGGGCACACCACCGAGGATGTCTCTCAAAGTATGCATACT	780
AY601680	ACACAAGAGGAGAACACAGAGAGGGCACACCACCGAGGATGTCTCTCAAAGTATGCATACT	780
AB295479	ACACAAGAGGAGAACACAGAGAGGGCACACCACCGAGGATGTCTCTCAAAGTATGCATACT	780
EF027879	ACACAAGAGGAGAACACAGAGAGGGCACACCACCGAGGATGTCTCTCAAAGTATGCATACT	780
AB331547	ACACAAGAGGAAAACACAGAGAGGGCACACCACCGAGGATGTTTCTCAAAGTATGCATACT	780
AJ390295	ACACAAGAGGAAAACACAGAGAGGGCACACCACCGAGGATGTTTCTCAAAGTATGCATACT	780
EF027891	ACACAAGAGGAAAACACAGAGAGGGCACACCACCGAGGATGTTTCTCAAAGTATGCATACT	780
AF255660	ACACAAGAGGAAAACACAGAGAGGGCACACCACCGAGGATGTTTCTCAAAGTATGCATACT	780
AJ133454	ACACAAGAGGAGAACACAGAGAGGGCACACCACCGAGGATGTCTCTCAAAGTATGCATACT	780
BR-AGA	ACACAAGAGGAGAACACAGAGAGGGCACACCACCGAGGATGTCTCTCAAAGTATGCATACT	780
AM411503	ACACAAGAGGAGAACACAGAGAGGGCACACCACCGAGGATGTCTCTCAAAGTATGCATACT	780
SGS-MO	ACACAAGAGGAGAACACAGAGAGGGCACACCACCGAGGATGTCTCTCAAAGTATGCATACT	780

***** **

“...Continua...”

FIGURA 1A "CONT."

GO-AST	CTACTTGGAGTCAAGAACATG-	801
SA-AST	CTACTTGGAGTCAAGAACATG-	801
MF-AST	CTACTTGGAGTCAAGAACATG-	801
SP-MO	CTACTTGGAGTCAAGATCATG-	801
IP-MON	CTACTTGGAGTCAAGAACATG-	801
PA-AGA2	CTACTTGGAGTCAAGAACATG-	801
PA-AGA1	CTACTTGGAGTCAAGAACATG-	801
ES-AGA	CTACTTGGAGTCAAGAACATG-	801
AN-AGA	CTACTTGGAGTCAAGAACATG-	801
LA-MON	CTACTTGGAGTCAAGAACATG-	801
IP-MAR	CTACTTGGAGTCAAGAAGATG-	801
MU-AGA	CTACTTGGAGTCAAGAACATG-	801
AJ390296	CTACTTGGAGTCAAGAACATG-	801
Z70237	CTACTTGGAGTCAAGAACATG-	801
X92078	CTACTTGGAGTCAAGAACATG-	801
X79305	CTACTTGGAGTCAAGAACATG-	801
AF325927	CTACTTGGAGTCAAGAACATGT	801
AY884982	CTACTTGGAGTCAAGAACATG-	801
EF027892	CTACTTGGAGTCAAGAACATG-	801
AY601680	CTACTTGGAGTCAAGAACATG-	801
AB295479	CTACTTGGAGTCAAGAACATG-	801
EF027879	CTACTTGGAGTCAAGAACATG-	801
AB331547	CTACTTGGAGTGAAGAACATG-	801
AJ390295	CTACTTGGAGTGAAGAACATG-	801
EF027891	CTACTTGGAGTCAAGAACATG-	801
AF255660	CTACTTGGAGTGAAGAACATG-	801
AJ133454	CTACTTGGAGTCAAGAACATG-	801
BR-AGA	CTACTTGGAGTCAAGAACATG-	801
AM411503	CTACTTGGAGTCAAGAACATG-	801
SGS-MO	CTACTTGGAGTCAAGAACATG-	801

***** **

```

GO-AST      GNDTIDTGGSTKKDAKQEQGSIQPNLNKEKEKDVNVGTSGTHTVPRIRAITSKMKMPKSK 60
SA-AST      GNDTIDTGGSTKKDAKQEQGSIQPNLNKEKEKDVNVGTSGTHTVPRIRAITSKMKMPKSK 60
MF-AST      GNDTIDTGGSTKKDAKQEQGSIQPNLNKEKEKDVNVGTSGTHTVPRIRAITSKMKMPKSK 60
SP-MO       GNDTLDTGGSTKKDAKQEQCSIQPNLNKEKEKDVNVGTSGTHTVPRIRAITSKMKMPKSK 60
IP-MON      GNDTLDTGGSSKKDAKQEQGSIQPNLNKEKEKDVNVGTSGTHTVPRIRAITSKMKMPKSK 60
PA-AGA2     GNDTLDTGGSPKKDAKQEQGSIQPNLNKEKEKDVNVGTSGTHTVPRIRAITSKMKMPKSK 60
PA-AGA1     GNDTLDTGGSTKKDAKQEQGSIQPNLNKEKEKDVNVGTSGTHTVPRIRAITSKMKMPKSK 60
ES-AGA      GNDTIDTGGSSKKDAKQEQGSIQPNLNKEKEKDVNVGTSGTHTVPRIRAITSKMKMPKSK 60
AN-AGA      GNDTVDTGGSSKKDAKQEQGSIQPNLNKEKEKDVNVGTSGTHTVPRIRAITSKMRMPKSK 60
LA-MON      GNDTLDAGGSTKKDAKQEQWRIQPNLNKEKEKDVNVGTSGTHTVPRIRAITSKMKMPKSK 60
MU-AGA      GNDTLDAGGSTPKKDAKQEQGSIQPILNKEKEKDVNVGTSGTHTVPRIRAITSKMRMPKSK 60
AJ390296    GNDTIDAGGSTKKDAKQEQGSIQPSLNKEKEKDVNVGTSGTHTVPRIRAITSKMRMPKSK 60
AY884982    GNDTIDAGGSTKKDAKQEQGSIQPSLNKEKEKDVNVGTSGTHTVPRIRAITSKMRMPKSK 60
AF325927    GNDTIDAGGSTKKDAKQEQGSIQPILNKEKEKDVNVGTSGTHTVPRIRAITSKMRMPKSK 60
X92078      GNDTIDAGGSTKKDAKQEQGSIQPILNKEKEKDVNVGTSGTHTVPRIRAITSKMRMPKSK 60
EF027892    GNDTIDAGGSTKKDAKQEQGSIQPNLNKEKEKDVNVGTSGTHTVPRIRAITSKMRMPKSK 60
AY601680    -NDTIDAGGSTKKDAKQEQGSIQPNLNKEKEKDVNVGTSGTHTVPRIRAITSKMRMPKSK 59
X79305      GNDTIDAGGSTKKDAKQEQGSIQPNLNKEKEKDVNVGTSGTHTVPRIRAITSKMRMPKSK 60
IP-MAR      GNDTIDAGGSTKKDAKQEQGSIQPNLNKEKEKDVNVGTSGTHTVPRIRAITSKMRMPKSK 60
EF027891    GNDTIDAGGSTKKDAKQEQGSIQPNLNKEKEKDVNVGTSGTHTVPRIRAITSKMRMPKSK 60
AJ390295    GNDTIDAGGSTKKDAKQEQGSIQPNPNKEKEKDVNVGTSGTHTVPRIRAITSKMRMPKSK 60
EF027879    GNDTIDAGGSTKKDAKQEQGSIQPNLNKEKEKDVNVGTSGTHTVPRIRAITSKMRMPKSK 60
AB295479    GNDTIDAGGSTKKDAKQEQGSIQPNLNKEKEKDVNVGTSGTHTVPRIRAITSKMRMPKSK 60
BR-AGA      GNDTIDAGGITKKGAKQEQCSIQPKLNKEKEKDVNVGTSGTHTVPRIRAITSKMRMPKSK 60
AB331547    GNDTIDAGGSTKKDAKQEQGSIQPNLNKEKEKDVNVGTSGTHTVPRIRAITSKMRMPKSK 60
Z70237      GNDTIDAGGSTKKDAKQEQGSIQPILNKEKEKDVNVGTSGTHTVPRIRAITSKMRMPKSK 60
AF255660    GNDTIDTGGSTKKDAKQEQGSIQPKLNKEKEKDVNVGTSGTHTVPRIRAITSKMRMPKSK 60
AM411503    GNDTIDAGGSTKKEAKQEQGSIQPNLNKEKEKDVNVGTSGTHTVPRIRAITSKMRMPKSK 60
AJ133454    GNDTIDAGGSTKKDAKQEQGSIQPNLNKEKEKDVNVGTSGTHTVPRIRAITSKMRMPKSK 60
SGS-MO      GNDTVDAGGVTKKDAKQEQGSIQPNLNKEKKKEMNVETSRTHTVPRIRLITSNMRMHKRRK 60
          ***:::** .** ***** ** *:::** ** *:::**: **:::** *
          "...Continua..."

```

FIGURA 2A Alinhamento das seqüências de aminoácidos do gene da capa protéica dos catorze isolados de PVY^{NTN} estudados, doze isolados desta mesma variante e quatro isolado de PVY^N disponíveis no GenBank.

FIGURA 2A “CONT.”

GO-AST	GATVLNLEHLLEYAPQQIDISNTRATQSQFDTWYEAVQLAYDIGETEMPTVMNGLMVWCI	120
SA-AST	GATVLNLEHLLEYAPQQIDISNTRATQSQFDTWYEAVQLAYDIGETEMPTVMNGLMVWCI	120
MF-AST	GATVLNLEHLLEYAPQQIDISNTRATQSQFDTWYEAVQLAYDIGETEMPTVMNGLMVWCI	120
SP-MO	GATVLNLEHLLEYAPQQIDISNTRATQSQFDTWYEAVQLAYDIGETEMPTVMNGLMVWCI	120
IP-MON	GATVLNLEHLLEYAPQQIDISNTRATQSQFDTWYEAVQLAYDIGETEMPTVMNGLMVWCI	120
PA-AGA2	GATVLNLEHLLEYAPQQIDISNTRATQSQFDTWYEAVQLAYDIGETEMPTVMNGLMVWCI	120
PA-AGA1	GATVLNLEHLLEYAPQQIDISNTRATQSQFDTWYEAVQLAYDIGETEMPTVMNGLMVWCI	120
ES-AGA	GATVLNLEHLLEYAPQQIDISNTRATQSQFDTWYEAVQLAYDIGETEMPTVMNGLMVWCI	120
AN-AGA	GATVLNLEHLLEYAPQQIDISNTRATQSQFDTWYEAVQLAYDIGETEMPTVMNGLMVWCI	120
LA-MON	GATVLNLEHLLEYAPQQIDISNTRATQSQFDTWYEAVQLAYDIGETEMPTVMNGLMVWCI	120
MU-AGA	GATVLNLEHLLEYAPQQIDISNTRATQSQFDTWYEAVQLAYDIGETEMPTVMNGLMVWCI	120
AJ390296	GATVLNLEHLLEYAPQQIDISNTRATQSQFDTWYEAVQLAYDIGETEMPTVMNGLMVWCI	120
AY884982	GATVLNLEHLLEYAPQQIDISNTRATQSQFDTWYEAVQLAYDIGETEMPTVMNGLMVWCI	120
AF325927	GATVLNLEHLLEYAPQQIDISNTRATQSQFDTWYEAVQLAYDIGETEMPTVMNGLMVWCI	120
X92078	GATVLNLEHLLEYAPQQIDISNTRATQSQFDTWYEAVQLAYDIGETEMPTVMNGLMVWCI	120
EF027892	GATVLNLEHLLEYAPQQIDISNTRATQSQFDTWYEAVQLAYDIGETEMPTVMNGLMVWCI	120
AY601680	GATVLNLEHLLEYAPQQIDISNTRATQSQFDTWYEAVQLAYDIGETEMPTVMNGLMVWCI	119
X79305	GATVLNLEHLLEYAPQQIDISNTRATQSQFDTWYEAVQLAYDIGETEMPTVMNGLMVWCI	120
IP-MAR	GATVLNLEHLLEYAPQQIDISNTRATQSQFDTWYEAVQLAYDIGETEMPTVMNGLMVWCI	120
EF027891	GATVLNLEHLLEYAPQQIDISNTRATQSQFDTWYEAVQLAYDIGETEMPTVMNGLMVWCI	120
AJ390295	GATVLNLEHLLEYAPQQIDISNTRATQSQFDTWYEAVQLAYDIGETEMPTVMNGLMVWCI	120
EF027879	GATVLNLEHLLEYAPQQIDISNTRATQSQFDTWYEAVQLAYDIGETEMPTVMNGLMVWCI	120
AB295479	GATVLNLEHLLEYAPQQIDISNTRATQSQFDTWYEAVQLAYDIGETEMPTVMNGLMVWCI	120
BR-AGA	GATVLNLEHLLEYAPQQIDISNTRATQSQFDTWYEAVQLAYDIGETEMPTVMNGLMVWCI	120
AB331547	GATVLNLEHLLEYAPQQIDISNTRATQSQFDTWYEAVQLAYDIGETEMPTVMNGLMVWCI	120
Z70237	GATVLNLEHLLEYAPQQIDISNTRATQSQFDTWYEAVQLAYDIGETEMPTVMNGLMVWCI	120
AF255660	GATVLNLEHLLEYAPQQIDISNTRATQSQFDTWYEAVQLAYDIGETEMPTVMNGLMVWCI	120
AM411503	GATVLNLEHLLEYAPQQIDISNTRATQSQFDTWYEAVQLAYDIGETEMPTVMNGLMVWCI	120
AJ133454	GATVLNLEHLLEYAPQQIDISNTRATQSQFDTWYEAVQLAYDIGETEMPTVMNGLMVWCI	120
SGS-MO	GATVLNLEHLLEYAPQQIDISNTRATQSQFDTWYEAVQLAYDIGETEMPTVMNGLMVWCI	120
	***** * * * * ***** : *****	

“...Continua...”

FIGURA 2A “CONT.”

GO-AST	ENGTSPNINGVWVMDGDEQVEYPLKPIVENAKPTLRQIMAHFSDVAEAYIEMRNKKEPY	180
SA-AST	ENGTSPNINGVWVMDGDEQVEYPLKPIVENAKPTLRQIMAHFSDVAEAYIEMRNKKEPY	180
MF-AST	ENGTSPNINGVWVMDGDEQVEYPLKPIVENAKPTLRQIMAHFSDVAEAYIEMRNKKEPY	180
SP-MO	ENGTSPNINGVWVMDGDEQVEYPLKPIVENAKPTLRQIMAHFSDVAEAYIEMRNKKEPY	180
IP-MON	ENGTSPNINGVWVMDGDEQVEYPLKPIVENAKPTLRQIMAHFSDVAEAYIEMRNKKEPY	180
PA-AGA2	ENGTSPNINGVWVMDGDEQVEYPLKPIVENAKPTLRQIMAHFSDVAEAYIEMRNKKEPY	180
PA-AGA1	ENGTSPNINGVWVMDGDEQVEYPLKPIVENAKPTLRQIMAHFSDVAEAYIEMRNKKEPY	180
ES-AGA	ENGTSPNINGVWVMDGDEQVEYPLKPIVENAKPTLRQIMAHFSDVAEAYIEMRNKKEPY	180
AN-AGA	ENGTSPNINGVWVMDGDEQVEYPLKPIVENAKPTLRQIMAHFSDVAEAYIEMRNKKEPY	180
LA-MON	ENGTSPNINGVWVMDGDEQVEYPLKPIVENAKPTLRQIMAHFSDVAEAYIEMRNKKEPY	180
MU-AGA	ENGTSPNINGVWVMDGDEQVEYPLKPIVENAKPTLRQIMAHFSDVAEAYIEMRNKKEPY	180
AJ390296	ENGTSPNVNGVWVMDGNEQVEYPLKPIVENAKPTLRQIMAHFSDVAEAYIEMRNKKEPY	180
AY884982	ENGTSPNINGVWVMDGDEQVEYPLKPIVENAKPTLRQIMAHFSDVAEAYIEMRNKKEPY	180
AF325927	ENGTSPNINGVWVMDGDEQVEYPLKPIVENAKPTLRQIMAHFSDVAEAYIEMRNKKEPY	180
X92078	ENGTSPNINGVWVMDGDEQVEYPLKPIVENAKPTLRQIMAHFSDVAEAYIEMRNKKEPY	180
EF027892	ENGTSPNINGVWVMDGDEQVEYPLKPIVENAKPTLRQIMAHFSDVAEAYIEMRNKKEPY	180
AY601680	ENGTSPNINGVWVMDGDEQVEYPLKPIVENAKPTLRQIMAHFSDVAEAYIEMRNKKEPY	179
X79305	ENGTSPNINGVWVMDGDEQVEYPLKPIVENAKPTLRQIMAHFSDVAEAYIEMRNKKEPY	180
IP-MAR	ENGTSPNINGVWVMDGDEQVEYPLKPIVENAKPTLRQIMAHFSDVAEAYIEMRNKKEPY	180
EF027891	ENGTSPNINGVWVMDGDEQVEYPLKPIVENAKPTLRQIMAHFSDVAEAYIEMRNKKEPY	180
AJ390295	ENGTSPNINGVWVMDGDEQVEYPLKPIVENAKPTLRQIMAHFSDVAEAYIEMRNKKEPY	180
EF027879	ENGTSPNINGVWVMDGDEQVEYPLKPIVENAKPTLRQIMAHFSDVAEAYIEMRNKKEPY	180
AB295479	ENGTSPNINGVWVMDGDEQVEYPLKPIVENAKPTLRQIMAHFSDVAEAYIEMRNKKEPY	180
BR-AGA	ENGTSPNINGVWVMDGDEQIEYPLKPIVENAKPTLRQIMAHFSDVAEAYIEMRNKKEPY	180
AB331547	ENGTSPNINGVWVMDGDEQIEYPLKPIVENAKPTLRQIMAHFSDVAEAYIEMRNKKEPY	180
Z70237	ENGTSPNINGVWVMDGDDQVEYPLKPIVENAKPTLRQIMAHFSDVAEAYIEMRNKKEPY	180
AF255660	ENGTSPNINGVWVMDGDEQVEYPLKPIVENAKPTLRQIMAHFSDVAEAYIEMRNKKEPY	180
AM411503	ENGTSPNINGVWVMDGDEQVEYPLKPIVENAKPTLRQIMAHFSDVAEAYIEMRNKKEPY	180
AJ133454	ENGTSPNINGVWVMDGDEQVEYPLKPIVENAKPTLRQIMAHFSDVAEAYIEMRNKKEPY	180
SGS-MO	ENGTSPNINGVWVMDGDEQVEYPLKPIVENAKPTLRQIMAHFSDVAEAYIEMRNKKEPY	180
	*****:*****:*:***** *****	

“...Continua...”

FIGURA 2A “CONT.”

GO-AST	MPRYGLVRNLRDGLSARYAFDFYEVTSTRTPVRAREAHIQMKAALKSAQPRLFGLDGGIS	240
SA-AST	MPRYGLVRNLRDGLSARYAFDFYEVTSTRTPVRAREAHIQMKAALKSAQPRLFGLDGGIS	240
MF-AST	MPRYGLVRNLRDGLSARYAFDFYEVTSTRTPVRAREAHIPMKAALKSAQPRLFGLDGGIS	240
SP-MO	MPRYGLVRNLRDGLSARYAFDFYEVTSTRTPVRAREAHIQMKAALKSAQPRLFGLDGGIS	240
IP-MON	MPRYGLVRNLRDGLSARYAFDFYEVTSTRTPVRAREAHIQMKAALKSAQPRLFGLDGGIS	240
PA-AGA2	MPRYGLVRNLRDGLSARYAFDFYEVTSTRTPVRAREAHIQMKAALKSAQPRLFGLDGGIS	240
PA-AGA1	MPRYGLVRNLRDGLSARYAFDFYEVTSTRTPVRAREAHIQMKAALKSAQPRLFGLDGGIS	240
ES-AGA	MPRYGLVRNLRDGLSARYAFDFYEVTSTRTPVRAREAHIQMKAALKSAQPRLFGLDGGIS	240
AN-AGA	MPRYGLVRNLRDGLSARYAFDFYEVTSTRTPVRAREAHIQMKAALKSAQPRLFGLDGGIS	240
LA-MON	MPRYGLVRNLRDGLSARYAFDFYEVTSTRTPVRAREAHIQMKAALKSAQPRLFGLDGGIS	240
MU-AGA	MPRYGLIRNLRDVGLSARYAFDFYEVTSTRTPVRAREAHIQMKAALKSAQPRLFGLDGGIS	240
AJ390296	MPRYGLIRNLRDVGLSARYAFDFYEVTSTRTPVRAREAHIQMKAALKSAQPRLFGLDGGIS	240
AY884982	MPRYGLVRNLRDGLSARYAFDFYEVTSTRTPVRAREAHIQMKAALKSAQPRLFGLDGGIS	240
AF325927	MPRYGLVRNLRDGLSARYAFDFYEVTSTRTPVRAREAHIQMKAALKSAQPRLFGLDGGIS	240
X92078	MPRYGLVRNLRDGLSARYAFDFYEVTSTRTPVRAREAHIQMKAALKSAQPRLFGLDGGIS	240
EF027892	MPRYGLVRNLRDGLSARYAFDFYEVTSTRTPVRAREAHIQMKAALKSAQPRLFGLDGGIS	240
AY601680	MPRYGLVRNLRDGLSARYAFDFYEVTSTRTPVRAREAHIQMKAALKSAQPRLFGLDGGIS	239
X79305	MPRYGLVRNLRDGLSARYAFDFYEVTSTRTPVRAREAHIQMKAALKSAQPRLFGLDGGIS	240
IP-MAR	MPRYGLVRNLRDGLSARYAFDFYEVTSTRTPVRAREAHIQMKAALKSAQSRLFGLDGGIS	240
EF027891	MPRYGLVRNLRDGLSARYAFDFYEVTSTRTPVRAREAHIQMKAALKSAQSRLFGLDGGIS	240
AJ390295	MPRYGLVRNLRDGLSARYAFDFYEVTSTRTPVRAREAHIQMKAALKSAQSRLFGLDGGIS	240
EF027879	MPRYGLVRNLRDGLSARYAFDFYEVTSTRTPVRAREAHIQMKAALKSAQSRLFGLDGGIS	240
AB295479	MPRYGLVRNLRDGLSARYAFDFYEVTSTRTPVRAREAHIQMKAALKSAQSRLFGLDGGIS	240
BR-AGA	MPRYGLVRNLRDGLSARYAFDFYEVTSTRTPVRAREAHIQMKAALKSAQSRLFGLDGGIS	240
AB331547	MPRYGLVRNLRDGLSARYAFDFYEVTSTRTPVRAREAHIQMKAALKSAQSRLFGLDGGIS	240
Z70237	MPRYGLVRNLRDGLSARYAFDFYEVTSTRTPVRAREAHIQMKAALKSAQSRLFGLDGGIS	240
AF255660	MPRYGLVRNLRDGLSARYAFDFYEVTSTRTPVRAREAHIQMKAALKSAQSRLFGLDGGIS	240
AM411503	MPRYGLVRNLRDGLSARYAFDFYEVTSTRTPVRAREAHIQMKAALKSAQSRLFGLDGGIS	240
AJ133454	MPRYGLVRNLRDGLSARYAFDFYEVTSTRTPVRAREAHIQMKAALKSAQSRLFGLDGGIS	240
SGS-MO	MPRYGLVRNLRGLSARYAFDFYEVTSTRTPVRAREAHIQMKAALKSAQSRLFGLDGGIS	240

*****.****. *****.*****

“...Continua...”

FIGURA 2A “CONT.”

GO-AST	TQEENTERHTTDDVTQSMHTLLGVKNM	267
SA-AST	TQEENTERHTTDDVTQSMHTLLGVKNM	267
MF-AST	TQEENTERHTTEDVTQSMHTLLGVKNM	267
SP-MO	TQEENTERHTTEDVTQSMHTLLGVKIM	267
IP-MON	TQEENTERHTTEDVTSMHTLLGVKNM	267
PA-AGA2	TQEENTERHTTEDVTSMHTLLGVKNM	267
PA-AGA1	TQEENTERHTTEDVTSMHTLLGVKNM	267
ES-AGA	TQEENTERHTTEDVTSMHTLLGVKNM	267
AN-AGA	TQEENTERHTTEDVTSMHTLLGVKNM	267
LA-MON	TQEENTERHTTEDVSMHTLLGVKNM	267
MU-AGA	TQEENTERHTTEDVSMHTLLGVKNM	267
AJ390296	TQEENTERHTTEDVSPSMHTLLGVKNM	267
AY884982	TQEENTERHTTEDVSPSMHTLLGVKNM	267
AF325927	TQEENTERHTTEDVSPSMHTLLGVKNM	267
X92078	TQEENTERHTTEDVSPSMHTLLGVKNM	267
EF027892	TQEENTERHTTEDVSPSMHTLLGVKNM	267
AY601680	TQEENTERHTTEDVSPSMHTLLGVKNM	266
X79305	TQEENTERHTTEDVSPSMHTLLGVKNM	267
IP-MAR	TQEENTERHTTEDVSMHTLLGVKCM	267
EF027891	TQEENTERHTTEDVSPSMHTLLGVKNM	267
AJ390295	TQEENTERHTTEDVSPSMHTLLGVKNM	267
EF027879	TQEENTERHTTEDVSPSMHTLLGVKNM	267
AB295479	TQEENTERHTTEDVSPSMHTLLGVKNM	267
BR-AGA	TQEENTERHTTEDVSPSMHTLLGVKNM	267
AB331547	TQEENTERHTTEDVSPSMHTLLGVKNM	267
Z70237	TQEENTERHTTEDVSPSMHTLLGVKNM	267
AF255660	TQEENTERHTTEDVSPSMHTLLGVKNM	267
AM411503	TQEENTERHTTEDVSPSMHTLLGVKNM	267
AJ133454	TQEENTERHTTEDVSPSMHTLLGVKNM	267
SGS-MO	TQEENTERHTTEDVSPSMHTLLGVKNM	267
	*****:***:***** *	